

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**Daniela Teixeira Rodrigues**

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ALPHABACULOVÍRUS INFECTIVO PARA LARVAS  
DE *Spodoptera eridania* (CRAMER, 1782) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E A  
EVOLUÇÃO DE UM GENE HOMÓLOGO DE *condroitina liase* EM BACULOVÍRUS**

Santa Maria, RS

2020

**Daniela Teixeira Rodrigues**

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ALPHABACULOVÍRUS INFECTIVO PARA LARVAS  
DE *Spodoptera eridania* (CRAMER, 1782) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E A  
EVOLUÇÃO DE UM GENE HOMÓLOGO DE *condroitina liase* EM BACULOVÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo

Santa Maria, RS

2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Rodrigues, Daniela

CARACTERIZAÇÃO DE UM ALPHABACULOVÍRUS INFECTIVO PARA LARVAS DE *Spodoptera eridania* (CRAMER, 1782) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E A EVOLUÇÃO DE UM GENE HOMÓLOGO DE condroitina liase EM BACULOVÍRUS / Daniela Rodrigues. 2020.

56 p.; 30 cm

Orientador: Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2020

1. Baculovirus 2. Genômica 3. *Spodoptera eridania* nucleopolyhedrovirus 4. Biopesticida 5. Condroitina liase I. Mendes Pereira Ardisson de Araújo, Daniel II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, DANIELA RODRIGUES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Daniela Teixeira Rodrigues**

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ALPHABACULOVÍRUS INFECTIVO PARA LARVAS  
DE *Spodoptera eridania* (CRAMER, 1782) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E A  
EVOLUÇÃO DE UM GENE HOMÓLOGO DE *condroitina liase* EM BACULOVÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

**Aprovada em 21 de agosto de 2020:**

---

**Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo, Dr. (UFSM) (Presidente/Orientador)**

---

**José Luiz Wolff, Dr. (Mackenzie)**

---

**Marlinda Lobo de Souza, Dra. (EMBRAPA)**

Santa Maria, RS

2020

## **DEDICATÓRIA**

*Às minhas famílias, de sangue e de coração.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço de todo coração ao grande alquimista do universo, essa força que me concedeu o privilégio da vida e todas as situações favoráveis dentro de um mundo de infinitas probabilidades que por vezes chamamos de sorte. A minha mãe, pai e irmão, pilares fundamentais em minha construção como ser humano, por todos os sacrifícios que passaram em meu nome, por todos exemplos e ensinamentos que me direcionaram até aqui e por todo o incentivo que tive, desde que me conheço por gente, a seguir os meus instintos e vontades, muito obrigada. Aos meus avós, minhas fontes de inspirações em todos os momentos em que me encontro buscando força e fôlego para seguir e por todo o ensinamento que passaram a diante aos seus netos. Aos meus amigos e amigas, a minha família de coração, por todo o apoio, colo e compreensão em meus momentos difíceis e por comemorarem comigo todas as minhas vitórias. Ao professor Rafael, que me apresentou a vida acadêmica e sempre incentivou a explorar e aproveitar todas as oportunidades. Ao meu orientador Daniel, por me acolher e me apresentar um mundo completamente novo do qual eu estava acostumada, por ter sido paciente com meu processo e por ter me permitido a aquisição e troca de conhecimentos que hoje me constituem como profissional. Aos meus colegas de laboratório, por todos os momentos de aprendizado, descontração e ajudas nos sufocos da vida acadêmica. Agradeço aos membros da banca de qualificação e defesa, que avaliaram e contribuíram para este trabalho. Agradeço ao PPGBTIX e a UFSM pelo acolhimento e pela oportunidade. E a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

“Nós os conduzimos até a borda e pedimos que voassem. Eles não arredaram o pé. Voem, dissemos. Eles não se mexeram. Nós os empurramos para o abismo. E eles voaram.”

Guillaume Apollinaire

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO DE UM ALPHABACULOVÍRUS INFECTIVO PARA LARVAS DE *Spodoptera eridania* (CRAMER, 1782) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E A EVOLUÇÃO DE UM GENE HOMÓLOGO DE *condroitina liase* EM BACULOVÍRUS

AUTORA: Daniela Teixeira Rodrigues

ORIENTADOR: Daniel Mendes Pereira Ardisson-araújo

A lagarta-das-vagens (*Spodoptera eridania*) é nativa dos trópicos americanos e é considerada uma praga polifágica de grande importância econômica em diversas culturas no Brasil. Neste trabalho, um novo alphabaculovírus isolado de *S. eridania* foi caracterizado em níveis estrutural, biológico e molecular. O isolado pertence à coleção de vírus da EMBRAPA-Soja (Londrina, PR) e recebeu o nome de *Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus* isolado CNPSo-165 (SperNPV-CNPSo-165). Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão e varredura evidenciaram que os corpos de oclusão de SperNPV-CNPSo-165 apresentam formato poliédrico com múltiplos virions por nucleocapsídeo. O vírus demonstrou letalidade para o terceiro instar de larvas de *S. eridania* e *S. albula*, mas não para *S. frugiperda* nas concentrações testadas. O genoma de SperNPV-CNPSo-165 apresenta 137.373 pb, 151 ORFs, 4 regiões repetitivas e conteúdo de G+C de 42,8%. Análise filogenética baseada nos 38 genes core de baculovírus indicou que o novo vírus está proximoamente relacionado ao ancestral comum mais recente de isolados de outras espécies dentro do complexo *Spodoptera*, incluindo um alphabaculovírus isolado também de *S. eridania* (SperNPV-251). Surpreendentemente, o SperNPV-CNPSo-165 apresenta uma única cópia do gene *odv-e66*, um homólogo bacteriano de *condroitina liase*, enquanto que os vírus intimamente relacionados apresentam duas cópias. Portanto, a evolução da *odv-e66* na família *Baculoviridae* foi investigada. Treze deleções, dezesseis aquisições e uma duplicação da *odv-e66* foi encontrada entre os genomas dos baculovírus até então caracterizados. As análises sugerem que o genoma do SperNPV-CNPSo-165 parece ter sofrido perda independente de uma das cópias do gene. Dessa forma, estudos relacionados à caracterização e a evolução dos baculovírus podem fornecer informações importantes para o desenvolvimento e aprimoramento de ferramentas de controle biológico.

**Palavras-chave:** Baculovirus. Genômica. *Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus*. Biopesticida. *Condroitina liase*.



## ABSTRACT

### CARACTERIZAÇÃO DE UM ALPHABACULOVÍRUS INFECTIVO PARA LARVAS DE *Spodoptera eridania* (CRAMER, 1782) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E A EVOLUÇÃO DE UM GENE HOMÓLOGO DE *condroitina liase* EM BACULOVÍRUS

AUTHOR: DANIELA TEIXEIRA RODRIGUES

ADVISOR: DANIEL MENDES PEREIRA ARDISSON-ARAÚJO

The southern armyworm (*Spodoptera eridania*) is native to the American tropics and is considered a polyphagous pest of great economic importance in several crops of Brazil. In this work, a new alphabaculovirus isolated from *S. eridania* was characterized at structural, biological and molecular levels. The isolate belongs to the EMBRAPA-Soja virus collection (Londrina, PR) and received the name *Spodoptera eridania* nucleopolyhedrovirus CNPSO-165 (SperNPV-CNPSO-165). Transmission and scanning electron microscopy showed that the SperNPV-CNPSO-165 occlusion bodies have a polyhedral shape with multiple virions per nucleocapsid. The virus demonstrated lethality for the third instar of *S. eridania* and *S. albula* (Walker) larvae, but not for *S. frugiperda* (J.E. smith) at the tested concentrations. The SperNPV-CNPSO-165 genome has 137,373 bp, 151 ORFs, 4 repetitive regions and a G+C content of 42.8%. Phylogenetic analysis based on the 38 baculovirus core genes indicated that the new virus is closely related to the common ancestor of isolates from other species within the *Spodoptera* complex, including another isolate also from *S. eridania* (SperNPV-251). Surprisingly, SperNPV-CNPSO-165 has a single copy of the *odv-e66* gene, a bacterial homologue of *chondroitin lyase*, while viruses closely related to SperNPV-CNPSO-165 have two copies. Therefore, the evolution of *odv-e66* in the *Baculoviridae* family was investigated. Thirteen deletions, sixteen acquisitions and one duplication of *odv-e66* were found among the genomes of the baculoviruses characterized until then. The analysis suggest that the SperNPV-CNPSO-165 genome appears to have suffered independent loss of one of the copies of the gene. Thus, studies related to the characterization and evolution of baculoviruses can provide important information for the development and improvement of biological control tools.

**Keywords:** Baculovirus. Genomic. *Spodoptera eridania* nucleopolyhedrovirus. Biopesticide. *Chondroitin lyase*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - *Spodoptera eridania* em sua fase larval e durante a fase adulta. **(A)** Larva de terceiro instar de *S. eridania* alimentando-se de folhas de algodão, a lagarta apresenta coloração verde escuro com cabeça marrom avermelhada e linha branca estreita no dorso. (Barra de escala = 200 mm). **(B)** *S. eridania* em fase adulta, o imago possui listras laterais amarelas e esbranquiçadas, com uma série de triângulos escuros dispersos no dorso ao longo do comprimento do corpo.....12

Figura 2 - Diagrama esquemático da família *Baculoviridae*. Relação histórico-evolutiva entre membros representativos de cada um dos quatro gêneros da família *Baculoviridae* e seus respectivos hospedeiros (ordem de insetos) são mostrados. Os *Alphabaculovirus* em azul claro e os *Betabaculovirus* em azul escuro possuem membros que infectam larvas de insetos da ordem Lepidoptera. *Gammabaculovirus* em vermelho apresentam membros infectivos para larvas de insetos da ordem Hymenoptera. E *Deltabaculovirus* em verde, compreende membros infectivos para larvas de insetos da ordem Diptera, em especial os mosquitos da família Culicidae.....14

Figura 3 - Diagrama esquemático dos dois fenótipos infectivos de baculovírus. **(A)** estrutura dos corpos de oclusão de baculovírus (OB), **(B)** víriões derivados de oclusão (ODV), reponsável pela infecção primária e **(C)** vírion brotado (do inglês, ‘budded vírus’ (BV)), responsável pela infecção secundária.....15

Figura 4 - Ciclo viral no inseto hospedeiro e infeccioso do baculovírus. **(A)** **(1)** Esquema transversal de uma larva de inseto. Um corpo de oclusão de baculovírus (OB) sendo ingerido por meio de alimentos contaminados de forma natural ou por pulverização de lavoura. **(2)** Os OBs atingem o intestino médio alcalino, a matriz proteica é dissolvida, **(3)** e ocorre liberando ODVs. **(4)** A membrana peritrófica é degradada por metaloproteases presentes na matriz cristalina junto às partículas virais. **(B)****(1)** Os ODVs entram na célula por fusão com microvilosidades das células epiteliais do intestino médio do hospedeiro mediante PIFs, **(2)** liberando os nucleocapsídeos para o citoplasma **(3)**. **(4)** Em seguida, os nucleocapsídeos são transportados para o núcleo via filamento de actina, sendo desmontados e liberado o genoma. **(5)** Os iniciais são transcritos **(6)** e traduzidos. **(7)** Algumas das proteínas translocam para o núcleo, participando da transcrição / replicação do genoma. **(8)** Estas proteínas também participam da montagem dos nucleocapsídeos no núcleo. **(9)** Na fase precoce da infecção viral, o nucleocapsídeo é transportado para o citoplasma, **(10)** adquirindo um envelope na membrana plasmática juntamente com as proteínas de fusão de envelope (EFPs) GP64 e F. **(11)** Os BVs possuem uma região pleolômerica formada por essas proteínas. **(12)** O fenótipo BV brota das células infectadas. **(13)** Via secretora das proteínas de fusão do envelope viral. **(14)** Região de cúmulo dessas proteínas e aquisição das mesmas para a formação do BV. **(15)** Na fase muito tardia da infecção, os nucleocapsídeos são envolvidos pela membrana nuclear interna e são ocluídos nos corpos de oclusão (OBs).....17

## ARTIGO 1

Figura 1. Caracterização do isolado SperNPV-CNPSO-165 obtido de cadavers da lagarta-das-vagens com sintomas de infecção por baculovírus. (A) Micrografia de microscopia eletrônica de varredura dos OBs SperNPV-CNPSO-165 mostrando seu formato poliédrico (barra de escala = 5,0  $\mu\text{m}$  e 2,0  $\mu\text{m}$ ). (B) Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão dos OBs de SperNPV-CNPSO-165 mostrando víriões embebidos na matriz (seta branca) com múltiplos nucleocapsídeos em forma de bastonete (ponta de seta preta) por ODV (ponta de seta branca). O cálice é apontado pela seta preta. (escala de barra = 2.0  $\mu\text{m}$  and 200 nm).....29

Figura 2. Filogenia de baculovírus. A filogenia mostra que SperNPV-CNPSO-165 é um alfabaculovírus proximamente relacionado à outros vírus isolados do gênero *Spodoptera*. O novo vírus compartilha um ancestral comum e está presente em um ramo contendo SeMNPV, SpltNPV-II e SperNPV-251. A árvore de máxima verossimilhança foi inferida com base nas sequências nucleotídicas concatenadas dos 38 core genes de vários genomas de baculovírus selecionados (Tabela S1) usando o método FastTree. O suporte do ramo foi determinado pelo método Shimodaira-Hasegawa (círculos fechados pretos e cinza). Alguns ramos foram colapsados para maior clareza: alfabaculovírus do grupo 1, betabaculovírus (rosa), gamabaculovírus (laranja) e deltabaculovírus (CuniNPV, azul claro). CuniNPV foi usado para enraizar a árvore.....30

Figura 3. Critério de demarcação de espécies utilizando Kimura-2 parâmetro ajustado (aK2P) e análise de conteúdo gênico de SperNPV-CNPSO-165 e outros vírus intimamente relacionados. (A) aK2P com base nos fragmentos parciais conservados dos genes *polh* / *lef-8* / *lef-9* dos vírus proximamente relacionados a SperNPV-CNPSO-165. As distâncias foram calculadas usando MEGA (modelo Kimura-2 parâmetro ajustado) [32], com base nos critérios de demarcação de espécies [28]. Em vermelho, mostramos os valores de SperNPV-CNPSO-165 que atendem ao critério para estabelecer uma nova espécie (mais de 0,072 substituição / local). (B) Diagrama de Venn comparando o conteúdo gênico entre SperNPV-CNPSO-165 e os vírus proximamente relacionados (SeMNPV-US1, SeMNPV-QD, SfMNPV-19 e SpltNPV-II). O conteúdo do gene foi comparado por BLASTX para encontrar homólogos. Um total de 243 genes foram encontrados: 122 compartilhados entre todos os quatro genomas de vírus e 16 foram encontrados apenas no genoma SperNPV-CNPSO-165.....30

Figura 4. Alinhamento MAFFT da sequência de aminoácidos prevista de *odv-e66* com foco no sítio ativo de vários baculovírus e outros organismos, incluindo bactérias, polidnavírus, nudivírus e hytrosavírus. O sítio ativo é composto por três resíduos conservados N, H e Y com base na caracterização de bactéria, que são destacados por asterisco e caixa preta. O clado 1 e o clado 2 pertencem ao clado de baculovírus que provavelmente sofreu uma duplicação independente durante a evolução do genoma. O clado 1 apresentou substituições de N para Y / F e H para D.....34

Figura 5. Inferência filogenética de *odv-e66*. Inferência filogenética com as sequências de nudivírus (rosa), alfabaculovírus (azul claro) e betabaculovírus (vermelho), vírus de dsDNA grande formam um clado monofilético, assim como ramos de baculovírus, representando uma entrada da bactéria neste grupo. Alguns ramos foram colapsados para maior clareza: Bactéria

(verde), hytrosavirus (cinza), himenóptero (marrom), alfabaculovírus grupo 1 (azul escuro), betabaculovírus (vermelho).....35

Figura 6. Contexto genômico e análises evolutivas da *odv-e66*, um homólogo do gene da condroitinase relacionado a bactérias. (A) Etapas evolutivas com eventos de ganho, perda e duplicação para *odv-e66* dentro da família *Baculoviridae*. Com base nas árvores filogenéticas hipotéticas e no contexto genômico, é apresentada a história de *odv-e66* e a presença em membros de baculovírus que infectam lepidópteros. A Tabela 3 resume os eventos hipotéticos evolutivos. O ganho é representado pelo quadrado na linha e a perda o quadrado acima da linha. (B) Contexto genômico das duas cópias de *odv-e66* (*odv-e66 A* e *odv-e66 B*) de acordo com a análise evolutiva do gene e o evento de duplicação em espécies proximamente relacionadas de SperNPV-CNPSO-165. As pontas de seta representam a direção dos genes no genoma. Setas com cores semelhantes descrevem a ortologia do gene.....36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus <i>Celsius</i>
x g	velocidade de sedimentação gravitacional
BV	do inglês, 'budded virus' (vírus brotado)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
drs	do inglês, 'direct repeats' (repetições diretas)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	grama
GV	Granulovirus
h	horas
HGT	do inglês, 'horizontal gene transfer' (transferência horizontal de genes)
h p.i.	horas pós-infecção
hrs	do inglês, 'homologous regions' (regiões homólogas)
ICTV	do inglês, 'International Committee on Taxonomy of Viruses' (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)
kDa	kiloDalton
kpb	kilo-pares de bases
LC <sup>50</sup>	do inglês, 'Lethal Concentration' (concentração letal)
<i>lef-8</i>	do inglês, 'Late Expression Factor 8' (fator de expressão tardia 8)
<i>lef-9</i>	do inglês, 'Late Expression Factor 9' (fator de expressão tardia 9)
M	molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
m.r.c.a	do inglês, 'most recent common ancestor' (ancestral comum mais recente)
NPV	nucleopolyhedrovirus
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanogramas
OB	do inglês, 'occlusion body' (corpo de oclusão)
ODV	do inglês, 'occluded-derived virus' (vírus derivado de oclusão)
<i>odv-e66</i>	do inglês, 'occlusion-derived virus envelope protein 66' (proteína de envelope de ODV 66)

ORF	do inglês, 'open reading frame' (fase de leitura aberta)
pb	pares de base
pH	concentração de íon hidroxônio livre
PIF	do inglês, ' <i>per os</i> infectivity fator' (fator de infectividade oral)
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
rr	repeat regions
SDS	do inglês, sodium dodecyl sulfate
SpexNPV	Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus
SfMNPV	Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus
SpltMNPV	Spodoptera litura multiple nucleopolyhedrovirus
SeMNPV	Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus
SEM	do inglês, 'scanning electron microscopy' (microscopia eletrônica de varredura)
SpexNPV	Spodoptera exempta nucleopolyhedrovirus
dsDNA	desoxirribonucleato de dupla-fita
TEM	do inglês, 'transmission electron microscopy' (microscopia eletrônica de transmissão)
μl	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
2.1 A LAGARTA-DAS-VAGENS <i>Spodoptera eridania</i> .....	11
2.2 PESTICIDAS QUÍMICOS E O CONTROLE BIOLÓGICO .....	12
2.3 A FAMÍLIA <i>BACULOVIRIDAE</i> .....	16
2.4 CORPOS DE COLUSÃO E FENÓTIPOS VIRAIS .....	17
2.5 CICLO DE VIDA E INFECÇÃO NO HOSPEDEIRO.....	18
2.6 BACULOVÍRUS: FUNÇÕES DIVERSAS E USO NO CONTROLE BIOLÓGICO.....	21
2.7 SULFATO DE CONDRITINA, <i>condroitina liases</i> e <i>odv-e66</i> .....	23
2.8 O SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS DE BACULOVÍRUS .....	25
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICE A – FIGURA SUPLEMENTAR 1 .....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE B – TABELA SUPLEMENTAR 2 .....</b>	<b>55</b>
<b>APÊNDICE C – TABELA SUPLEMENTAR 3 .....</b>	<b>56</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação se dedica ao sequenciamento completo, a descrição e a caracterização do genoma de um novo baculovírus e está estruturada da seguinte forma: o item **INTRODUÇÃO** contém uma revisão da literatura sobre os temas a serem abordados na dissertação; seguido dos **OBJETIVOS** do trabalho. Os **RESULTADOS** estão apresentados na forma de um artigo com o título: “Characterization of a novel alphabaculovirus isolated from the Southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) and the evolution of *odv-e66*, a bacterium-acquired baculoviral chondroitinase gene”. O artigo contém as seções: **INTRODUCTION; MATERIAL AND METHODS; RESULTS AND DISCUSSION** e **CONCLUSION**. O item **CONCLUSÃO** está no final da dissertação e propõe um fechamento em resposta aos objetivos. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** correspondem somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** da dissertação. As demais referências bibliográficas estão presentes no corpo do artigo publicado.



## 2 INTRODUÇÃO

### 2.1 A LAGARTA-DAS-VAGENS *Spodoptera eridania*

O gênero *Spodoptera* Guenée (1852) agrupa várias espécies amplamente conhecidas por serem pragas-agrícolas de hábito polífago. Pelo menos 15, das 30 espécies já descritas dentro do gênero, são consideradas insetos-praga que vêm crescendo em importância econômica em diversas culturas (GALLO *et al.*, 2002; POGUE, 2002). *S. eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta-das-vagens, é nativa dos trópicos americanos e ocorre amplamente na América Central, América do Sul e em ilhas do Caribe (CAPINERA, 1999). Na fase larval, esta lagarta, de hábito majoritariamente noturno, apresenta coloração verde ou verde-escuro, com cabeça castanha clara ou marrom avermelhada e três linhas avermelhadas ou amareladas no dorso. Possui também linhas laterais com vários triângulos de cor escura, com forma de cabeças de setas que apontam para a linha central. A larva possui três pares de pernas torácicas, quatro abdominais e uma anal (Figura 1A). Já o inseto adulto pode medir até 4 cm de envergadura, apresentar coloração cinza com uma mancha ou faixa preta no centro das asas anteriores e asas posteriores esbranquiçadas (Figura 1B) (CAPINEIRA, 1999; MOREIRA & ARAGÃO, 2009).

No Brasil, devido à (1) alta densidade populacional de *S. eridania*, (2) a força de danos causados às monoculturas e (3) a ocorrência regular (BORTOLI *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2012), a lagarta-das-vagens emergiu do ‘status’ de praga-secundária para uma das principais pestes de importância econômica em culturas de soja, algodão, algumas espécies frutíferas e plantas daninhas (FORMENTINI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2010; BORTOLI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2005). Em consequência desse avanço, métodos alternativos de controle e manejo têm sido empregados, apesar de que o controle de *S. eridania* venha sendo realizado principalmente por meio de inseticidas químicos de amplo espectro como medida emergencial, uma vez que não existe um pesticida específico para indivíduos desta espécie (FRAGOSO *et al.*, 2015; MAPA, 2014).

**Figura 1.** *Spodoptera eridania* em sua fase larval e adulta.



FONTE: (1) Acervo pessoal e (2) adaptado de:  
<[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leaf/southern\\_armyworm.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leaf/southern_armyworm.htm)>

(A) Larva de terceiro instar de *S. eridania* alimentando-se de folhas de algodão, a lagarta apresenta coloração verde escuro com cabeça marrom avermelhada e linha branca estreita no dorso. (Barra de escala = 200 mm) (B) *S. eridania* em fase adulta, o imago possui listras laterais amarelas e esbranquiçadas, com uma série de triângulos escuros dispersos no dorso ao longo do comprimento do corpo.

## 2.2 PESTICIDAS QUÍMICOS E O CONTROLE BIOLÓGICO

As décadas de 1950 e 1960 foram marcadas pela expansão do uso de pesticidas químicos de amplo espectro, consumo esse que vem desde a Segunda Guerra Mundial onde os inseticidas desenvolvidos à época demonstravam eficácia e custo benefício atrativo para agricultores, substituindo assim metodologias tradicionais de controle químico, cultural e biológico disponíveis até então. Com o passar dos anos, a aplicação de agroquímicos continuou aumentando e até hoje é considerada a principal estratégia de controle de pragas agrícolas.

Pesticida é uma palavra geral utilizada para descrever vários grupos de inseticidas, fungicidas, herbicidas, produtos químicos utilizados em jardins, desinfetantes domésticos e rodenticidas que agem para eliminar ou proteger de pragas. Pesticidas sintéticos são compostos por produtos químicos artificiais não naturais e variam em suas propriedades química e físicas de uma classe para outra, tornando necessário categoriza-los de acordo com as suas propriedades e com base em seu uso. A classificação comum dos pesticidas químicos acontece com base em três fatores: a estrutura química do princípio ativo do pesticida, o modo de entrada e a ação do pesticida nos organismos alvo. Porém o método mais difundido e apropriado para classificar, está baseado na composição química e na descrição de princípios ativos, fornecendo evidências de sua eficácia e de suas propriedades químicas e físicas características. Assim, com base na sua composição química, podem ser classificados em quatro categorias principais:

organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (HASSAAN & EL NEMR, 2020).

Afim de melhorar o rendimento das colheitas, os pesticidas organoclorados foram desenvolvidos para a remoção de insetos e outras pragas agrícolas, onde a perda anual das safras na ausência de seu uso era significativa, chegando até a um terço da produção anual. Também foi utilizado para o combate de mosquitos vetores de doenças como malária, tifo e dengue. Seu modo de ação atua na interferência e na inibição das vias fisiológicas dos organismos alvos e de acordo com a sua estrutura química, os organoclorados abrangem um grupo vasto de agroquímicos como Diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seus metabólitos, diclorodifenildicloroetileno (DDE), Diclorodifenildicloroetano (DDD); Hexaclorociclohexano (HCH); Ciclodienos incluindo aldrina, dieldrina, endrina, heptacloro, clordano e endosulfan; Toxafeno; Mirex; Clordecona e entre outros. A única característica em comum é a presença do cloro como substituinte na molécula, sendo bem distintos entre si, também são altamente lipofílicos e resistentes à degradação microbiana e conseqüentemente, persistentes no meio ambiente. Alguns organoclorados (DDT, DDE e DDD) apresentam o tempo de meia-vida no campo de 15 anos, enquanto outros são de 9 a 365 dias (Aldrina e Toxafeno, respectivamente) (HASSAAN & EL NEMR, 2020; MARTYNIUK, MEHINTO & DENSLOW, 2020; RICHARDSON, 2019).

Os organofosforados são derivados do ácido fosfórico e estão entre os produtos químicos agrícolas mais usados no mundo todo, com mais de 100 compostos sintetizados. São manipulados, em sua grande maioria, como inseticidas, mas também se apresentam no mercado como fungicidas, herbicidas e rondeticidas, disponibilizados em pó, concentrado líquido ou grânulos. Sua estrutura química geral consiste em um átomo de fósforo ligado a um átomo de enxofre que deve ser metabolicamente ativado por meio de uma reação de dessulfuração para formar um oxon. A degradação desses compostos no ambiente é bem rápida e a umidade e a luz solar desempenham papéis importantes nessa transformação ambiental. O tempo de meia-vida de alguns organofosforados varia de 1 a 103 dias a 25°C (HASSAAN & EL NEMR, 2020; RICHARDSON, 2019; SURATMAN, EDWARDS & BABINA, 2015).

Carbamatos são compostos de ésteres orgânicos derivados do ácido dimetil N-metil-carbâmico e são usados como inseticidas, herbicidas, nematicidas e fungicidas. Também são utilizados na área da medicina e veterinária, bem como na profilaxia de envenenamento por organofosforados. Carbamatos como tiobencarbe, propoxur, molinato, dissulfiram, piridostigmina, metiocarbe e carbaril são amplamente utilizados em cães e gatos. Sua toxicidade

varia de acordo com a sua estrutura molecular (DE BLEECKER, 2008; HASSAAN & EL NEMR, 2020).

Piretróides são inseticidas químicos sintéticos similares às substâncias naturais derivados dos extratos de piretro das flores *Chrysanthemum cinerariaefolium*, também conhecidos como piretrina. Compartilham diversas características como alta toxicidade para artrópodes, de ação rápida especialmente contra insetos mastigadores e são pouco solúveis em água. Existem mais de 1000 piretróides diferentes e são um dos pesticidas agrícolas e domésticos amplamente usados como substância ativa em muitos tipos de produtos comerciais, como xampus para animais de estimação, tratamentos contra piolhos em humanos, ‘sprays’ para animais, repelentes de mosquitos de uso tópico e ‘sprays’ inseticida (COSTA, 2015; HASSAAN & EL NEMR, 2020).

Na época de liberação desses produtos para o comércio, havia poucos estudos e nenhum conhecimento sobre seus efeitos adversos no ambiente e em organismos fora de seu espectro de ação, como invertebrados e vertebrados. Apesar de muitos compostos demonstrarem eficácia após o uso, suprimindo os organismos que causam danos às culturas, as aplicações dessas substâncias geram inúmeras consequências. O impacto da intoxicação dos pesticidas em seres humanos está relacionado a uma gama de doenças oncológicas, hematológicas, disfunções pulmonares, deficiências no sistema imunológico, neurotoxicidade e disfunções no sistema nervoso central, bem como deformidades inatas. Pessoas que possuem contato direto com essas substâncias, como funcionários do meio agrícola, apresentam riscos diretos relacionados a intoxicação por contato com a pele e inalação durante o manuseio ou tratamento das plantações. A lixiviação de pesticidas na água também é um fator importante que causa impactos à saúde humana, através da ingestão de peixes e moluscos contaminados e a ingestão direta da água contaminada por pesticidas (HASSAAN & EL NEMR, 2020).

Além dos efeitos adversos nos seres humanos, estes compostos químicos estão envolvidos em uma ampla gama de poluentes e micropoluentes causando diversos efeitos negativos ao ambiente e os principais mecanismos de contaminação ambiental são a bioacumulação, bioconcentração e a biomagnificação. Além disso, os pesticidas também são responsáveis por causar a seleção de espécies resistentes, o extermínio de organismos não-alvo (por exemplo, inimigos naturais, polinizadores e artrópodes do solo) e surto de pragas secundárias nas monoculturas e ambientes circundantes (GULLAN & CRANSTON, 2010).

Diante disso, a implementação de metodologias alternativas que tenham como objetivo

principal a limitação de prejuízos econômicos e simultaneamente, minimização dos efeitos adversos no ambiente, bem como a redução ou substituição do uso de inseticidas químicos, tornou-se de interesse no mundo todo (SUN & PENG, 2007; SZEWCZYK et al., 2006).

O manejo integrado de pragas (MIP) é uma metodologia que vai de encontro com essa necessidade, tendo como filosofia a limitação dos danos econômicos causados pelos insetos-praga e, ao mesmo tempo, visando minimização dos efeitos adversos em organismos não-alvo destas culturas e no meio ambiente, bem como nos consumidores destes produtos. O MIP trabalha com a compatibilidade ou a integração entre diversas táticas de controle de populações de insetos e outros organismos de maneira complexa. Para a sua implementação, se torna fundamental ter conhecimento sobre os processos populacionais (crescimento, capacidade reprodutiva, competição, efeitos de predação e parasitismo) do inseto-praga e os efeitos dos fatores ambientais (clima, condições do solo, disponibilidade de água, nutrientes e abrigo) na cultura para adequar as várias técnicas de cultivo e controle em diferentes circunstâncias. Levando em conta os custos e benefícios sociais e ambientais, a fim de conservar a saúde a longo prazo e a produtividade do ecossistema, se aproximando da filosofia da agricultura orgânica. As técnicas utilizadas no MIP são: Controle biológico, controle cultural, melhoramento da resistência de plantas e técnicas que interferem na fisiologia ou reprodução do inseto, semioquímica (incorporação de ferormônios) e métodos de controle e regulação do crescimento de insetos. O uso de inseticidas químicos também faz parte do MIP, porém em níveis moderados, já que o foco principal é o estabelecimento de uma variedade de outros métodos de controle objetivando redução da dependência de inseticidas químicos (GULLAN & CRANSTON, 2010).

O controle biológico é uma abordagem que faz parte do MIP, na qual inimigos naturais e entomopatógenos (uni, multi ou acelulares) são aplicados intencionalmente podendo estabelecer-se em populações de insetos e, assim contribuir para a proteção das culturas por curto, médio e longo prazos. O controle biológico é dividido em três alternativas metodológicas: O clássico, onde envolve a importação e o estabelecimento de inimigos naturais de pragas com o objetivo de alcançar o controle da mesma com pouca assistência adicional; O aumentativo, que é a criação em massa de inimigos naturais e a liberação destes em sistemas de cultivo em momentos apropriados para combater as pragas e o Conservativo, onde os inimigos naturais são encorajados a proliferar dentro ou perto das plantações, e as aplicações de inseticidas são planejadas de forma que efeitos negativos mínimos ocorram. Os inimigos

naturais e entomopatógenos são conhecidos como agentes do controle biológico e se dividem em três grupos distintos: Os predadores, insetos que capturam e devoram suas presas, geralmente são maiores que as mesmas e possuem hábito polífago; Parasitóides, insetos parasitas que matam seu hospedeiro durante seu desenvolvimento, dentro ou sobre o corpo do mesmo e patógenos de insetos (GULLAN & CRANSTON, 2010; WRIGHT, 2014).

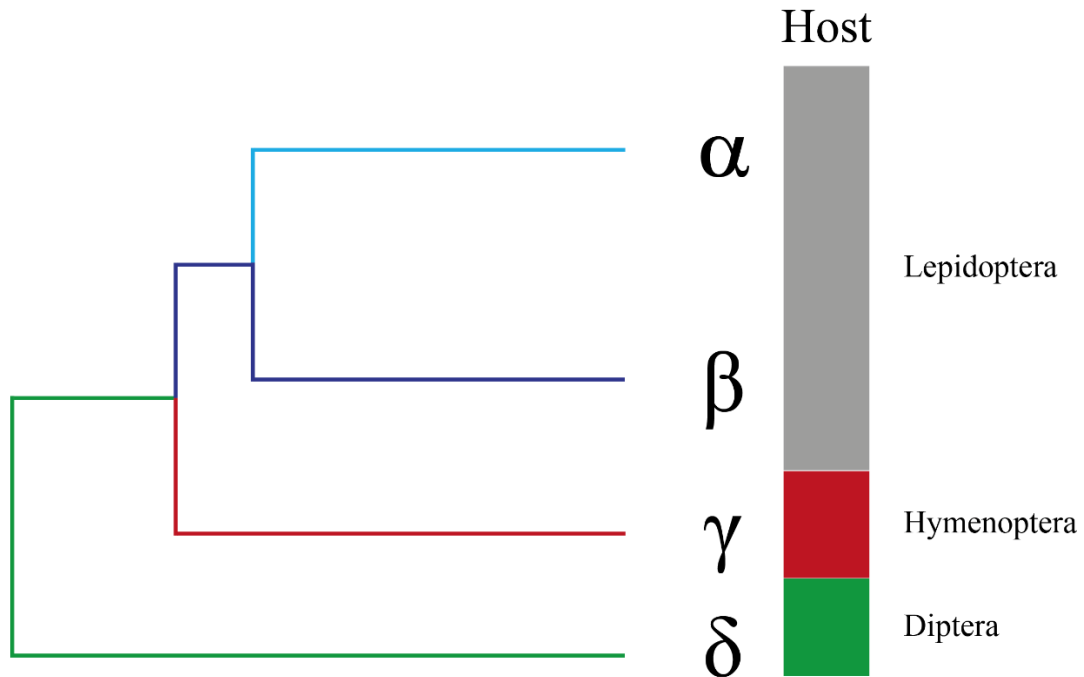
Dentro do grupo dos patógenos de insetos estão fungos, nematóides, bactérias e vírus podem efetivamente realizar o controle de pragas agrícolas quando aplicados artificialmente como inseticidas sobre uma monocultura (HAASE et al., 2015), sendo agentes atrativos de controle e alternativa viável ao uso de inseticidas químicos.

Entre os vírus de insetos encontrados na natureza, membros da família *Baculoviridae* são os mais bem caracterizados e considerados para o desenvolvimento da maioria dos biopesticidas virais comerciais devido a sua alta especificidade de hospedeiro, muitas vezes limitada a poucas ou única espécie, e segurança, não apresentando patogenicidade conhecida a vertebrados (SUN & PENG, 2007; SZEWCZYK et al., 2006).

### 2.3 A FAMÍLIA *BACULOVIRIDAE*

A família *Baculoviridae* compreende o mais estudado grupo de vírus específicos de insetos. Os membros dessa família possuem genoma de DNA dupla-fita circular com tamanho variando entre 80 a 180 kbp e podem codificar de 90 a 180 genes em seu genoma completo. A família está agrupada em quatro gêneros com base no alinhamento de 38 genes (denominados genes do 'core') compartilhados entre todos os baculovírus e que converge com o espectro de hospedeiro (GARAVAGLIA et al., 2012; JAVED et al., 2017). Os *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus* possuem membros infectivos para insetos da ordem dos lepidópteros (a fase larval de borboletas e mariposas), *Gammabaculovirus* contém membros que infectam larvas de himenópteros (estágio larval de vespas com comportamento parecido ao de lagartas de lepidópteros) e *Deltabaculovirus* compreende membros que infectam dípteros (estágio larval de mosquitos) (Figura 2) (JEHLE et al., 2006; ICTV, 2019).

**Figura 2.** Diagrama esquemático da família *Baculoviridae*



FONTE: Acervo do Laboratório de Virologia de Insetos, LaVI-UFSM.

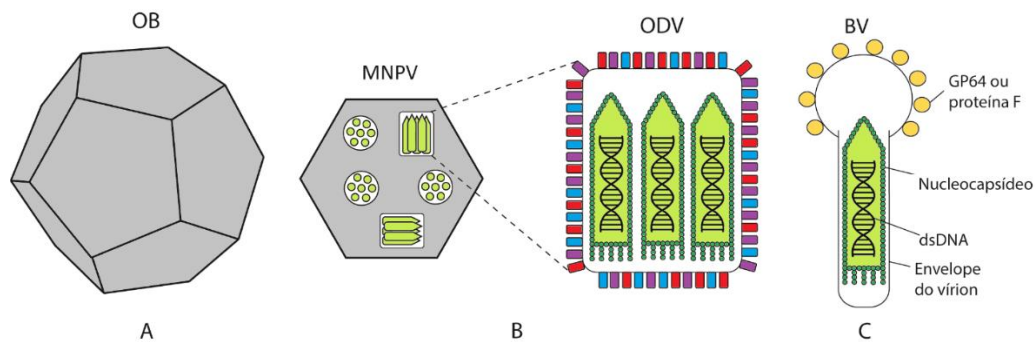
Relação histórico-evolutiva entre membros representativos de cada um dos quatro gêneros da família *Baculoviridae* e seus respectivos hospedeiros (ordem de insetos) são mostrados. Os *Alphabaculovirus* em azul claro e os *Betabaculovirus* em azul escuro possuem membros que infectam larvas de insetos da ordem Lepidoptera. *Gammabaculovirus* em vermelho apresentam membros infectivos para larvas de insetos da ordem Hymenoptera. E *Deltabaculovirus* em verde, compreende membros infectivos para larvas de insetos da ordem Diptera, em especial os mosquitos da família Culicidae (ICTV, 2019).

## 2.4 CORPOS DE COLUSÃO E FENÓTIPOS VIRAIS

O nome baculovírus se origina do latim *baculo* que significa bastão, termo proposto por Mauro Martignoni e que se refere à forma bacilar ou de bastonete dos nucleocapsídeos virais. Como uma característica importante compartilhada por todos os baculovírus, uma de suas formas virais apresenta uma estrutura de resistência responsável por proteger os vírions de adversidades ambientais, formada por uma matriz cristalina chamada de corpo de oclusão (OB, do inglês ‘occlusion body’) e está presente em todos os membros da família (ROHRMANN, 2020). Os OBs são compostos principalmente por uma proteína chamada poliedrina (*polh*) nos nucleopoliedrovírus (NPV) ou granulina (*gran*) nos granulovírus (GV), responsáveis pela morfologia do OB. Assim, os vírus também podem ser divididos em dois grandes grupos de

acordo com o formato desta estrutura, onde os NPVs exibem formato poliédrico (Figura 3A) e agrupam os alpha, gamma e deltabaculovirus e os GVs exibem formato granular e contém apenas os betabaculovirus. Estas denominações, apesar de não naturais (*i.e.* parafiléticas) ainda são importantes para nomear espécies em baculovírus. Durante o ciclo de infecção, os baculovírus produzem dois fenótipos virais, o vírus derivado de oclusão (ODV, do inglês ‘occlusion-derived virus’) responsável pela infecção primária (Figura 3B) e o vírus extracelular ou vírus brotado (BV, do inglês ‘budded virus’), responsável pela infecção secundária, disseminando a infecção pelo corpo do hospedeiro (Figura 3C) (JEHLE *et al.*, 2006; SLACK & ARIF, 2007).

**Figura 3.** Diagrama esquemático dos dois tipos de fenótipos infectivos de baculovírus.



FONTE: Acervo do Laboratório de Virologia de Insetos, LaVI-UFSM.

(A) estrutura dos corpos de oclusão de baculovírus (OB), (B) vírions derivados de oclusão (ODV), responsável pela infecção primária e (C) vírion brotado (do inglês, ‘budded vírus’ (BV)), responsável pela infecção secundária.

## 2.5 CICLO DE VIDA E INFECÇÃO NO HOSPEDEIRO

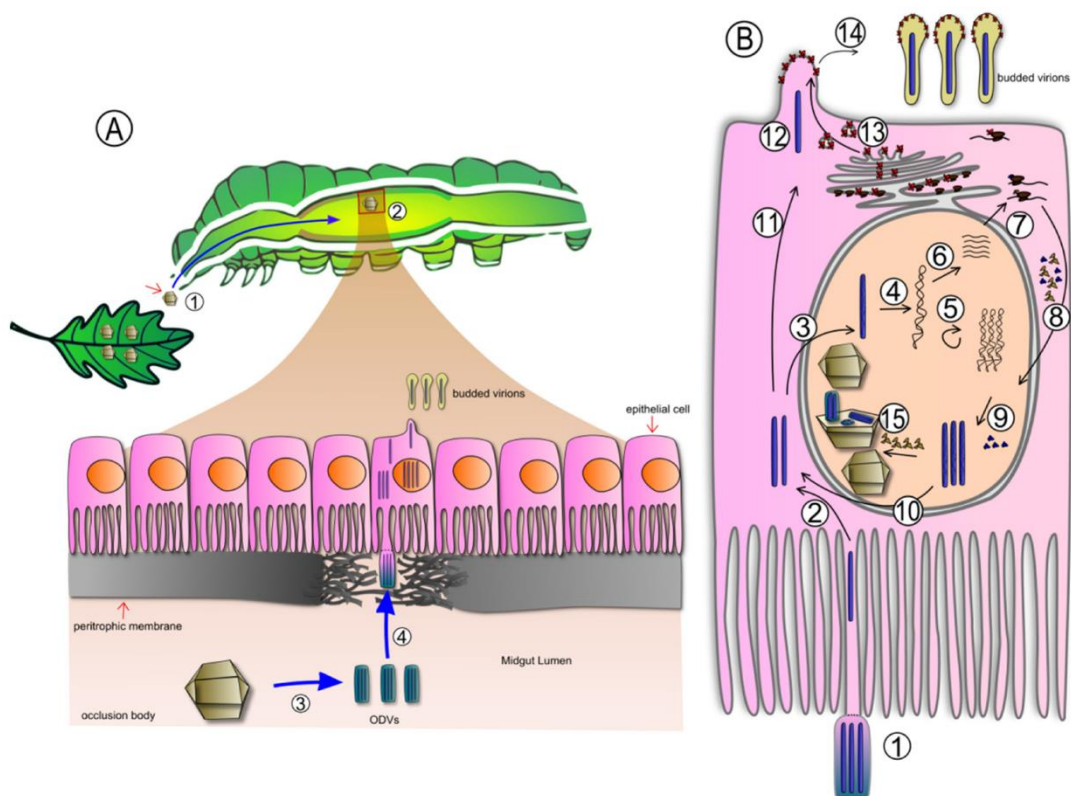
O ciclo infectivo dos baculovírus inicia quando o hospedeiro se alimenta de substratos contaminados de forma natural ou artificial com OBs (Figura 4A-1). A proteína que envolve os vírions (granulina ou poliedrina) é solubilizada em meio alcalino (pH 10-11) no intestino médio do inseto, liberando os ODVs no lúmen do órgão (Figura 4A-2). Após a liberação, enzimas liberadas com os ODVs rompem a membrana peritrófica e permitem a passagem dos vírions em direção ao epitélio de modo que os vírions se fundem às microvilosidades das células (Figura 4A-3 e Figura 4A-4). ODVs liberam os nucleocapsídeos no citosol da célula,



estabelecendo a infecção primária (ROHRMANN, 2020; SLACK & ARIF, 2007). Este processo de entrada é mediado por um grupo de proteínas do envelope viral chamado fatores de infecciosidade *per os* (PIFs, do inglês ‘*per os infectivity factors*’), essenciais para a infectividade oral do vírus (PENG *et al.*, 2012). Após a entrada na célula, os nucleocapsídeos são transportados para a membrana nuclear via filamento de actina, passando pelo poro nuclear (OHKAWA *et al.*, 2010) (Figura 4B-1). Uma vez no núcleo, os nucleocapsídeos são desmontados, o DNA é liberado e a cascata de transcrição é iniciada (Figura 4B-2 e Figura 4B-3). A RNA polimerase II do hospedeiro é responsável pela transcrição de genes virais em estágio inicial e os mRNAs virais são enviados para o citosol onde ocorre a tradução e a produção de proteínas funcionais (Figura 4B-4, Figura 4B-5 e Figura 4B-6). Proteínas precoces e associadas ao vírion são responsáveis pela modificação do funcionamento regular da célula hospedeira, afim de preparar a célula para a fase de replicação do genoma e montagem de novos vírions (ROHRMANN, 2020; SLACK & ARIF, 2007) (Figura 4B-7 e Figura 4B-8). Por volta de 12 h pós-infecção (p.i.) ocorre a replicação e montagem dos novos vírions e dá-se o início da fase tardia da infecção, com a ocorrência de hipertrofia nuclear, onde o estroma virogênico se expande e preenche a maior parte do núcleo (SLACK & ARIF, 2007). Entre 12 e 20 h p.i., o fenótipo viral BV é produzido. Nucleocapsídeos migram para fora do estroma virogênico, adquirindo um envelope da membrana nuclear para produzir BV (GP64 ou proteína F) (Figura 4B-9 e Figura 4B-10). Este virion brota do intestino médio e vai em direção à hemolinfa do inseto para infectar outros tecidos internos. A infecção de células saudáveis ocorre por endocitose adsortiva, onde o BV é endocitado e a fusão da membrana do envelope com a membrana do endossoma ocorre por meio da diminuição do pH da vesícula (Figura 4B-11 e Figura 4B-12). Nucleocapsídeos são liberados e transportados via citoesqueleto, iniciando nova replicação viral e produzindo novos BVs. Os BVs brotam e continuam a disseminar o processo infeccioso entre vários tecidos internos do hospedeiro, como traqueoblastos, hemócitos e corpos gordurosos. A fase muito tardia começa 20 h p.i. quando o estroma virogênico recua e a infecção viral prioriza a produção de ODVs. O retículo endoplasmático, a membrana nuclear externa e interna e o complexo de poro nuclear atuam como uma rede contínua de membranas para fornecer proteínas ao envelope dos ODV (BRAUNAGEL *et al.*, 2003; SLACK & ARIF, 2007; SHI *et al.*, 2015). O processo de oclusão dos ODVs e formação dos OBs ocorre 24 e 48 h p.i., de modo que os OBs são geralmente liberados do núcleo da célula infectada e espalhados no ambiente pela liberação lítica (Figura 4B-14). No final da infecção os insetos apresentam

características típicas de infecção por baculovírus, como o tegumento amarelado e liquefeito com pigmentos melanóticos e comportamento de escalada ou doença do topo da árvore (do inglês, ‘tree-top disease’), migrando para a folhagem superior da planta e morrendo pendurada e liquefeita, aumentando o espalhamento viral (FEDERICCI, 1997; CLEM e PASSARELLI, 2013).

**Figura 4.** Ciclo viral no inseto hospedeiro e infeccioso do baculovírus.



FONTE: HAASE; SCIOCCO-CAP; ROMANOWSKI, 2015.

(A) (1) Esquema transversal de uma larva de inseto. Um corpo de oclusão de baculovírus (OB) sendo ingerido por meio de alimentos contaminados de forma natural ou por pulverização de lavoura. (2) Os OBs atingem o intestino médio alcalino, a matriz proteica é dissolvida, (3) e ocorre liberando ODVs. (4) A membrana peritropical é degradada por metaloproteases presentes na matriz cristalina junto às partículas virais. (B)(1) Os ODVs entram na célula por fusão com microvilosidades das células epiteliais do intestino médio do hospedeiro mediante PIFs, (2) liberando os nucleocapsídeos para o citoplasma (3). (4) Em seguida, os nucleocapsídeos são transportados para o núcleo via filamento de actina, sendo desmontados e liberado o genoma. (5) Os iniciais são transcritos (6) e traduzidos. (7) Algumas das proteínas translocam para o núcleo, participando da transcrição / replicação do genoma. (8) Estas proteínas também participam da montagem dos nucleocapsídeos no núcleo. (9) Na fase precoce da infecção viral, o nucleocapsídeo é transportado para o citoplasma, (10) adquirindo um envelope na membrana plasmática juntamente com as proteínas de fusão de envelope (EFPs) GP64 e F. (11) Os BVs possuem uma região pleolômerica formada por essas proteínas. (12) O fenótipo BV brota das células infectadas. (13) Via secretora das proteínas de fusão do envelope viral. (14) Região de cúmulo dessas proteínas e aquisição das mesmas para a formação do BV. (15) Na fase muito tardia da infecção, os nucleocapsídeos são envolvidos pela membrana nuclear

interna e são ocluídos nos corpos de oclusão (OBs).

## 2.6 BACULOVÍRUS: FUNÇÕES DIVERSAS E USO NO CONTROLE BIOLÓGICO

Os baculovírus também são utilizados como ferramentas biotecnológicas em diversas áreas como vetores de expressão de proteínas recombinantes devido ao seu alto nível de expressão de genes heterólogos usando promotores de genes baculovirais envolvidos no processo de oclusão, onde seu primeiro relato de uso foi para a expressão de proteínas beta interferon em células de insetos (SMITH *et al.*, 1983; VAN OERS *et al.*, 2015). Estudos com base nesse sistema permitiu a utilização dos baculovírus na área médica e veterinária através da produção de vacinas baseadas em vírus-like protein (VLP) como a vacina contra o circovirus suíno a Circoflex™ e contra o Papilomavirus humano a Cervarix ® (MENA & KAMEN, 2011). Além disso, os baculovírus são candidatos potenciais como vetores de terapia gênica (ROHRMANN, 2020).

Entretanto, inerente ao fato de que são vírus específicos de inseto, os baculovírus são alternativas viáveis no controle biológico de insetos-pragas na agricultura e áreas florestais (RIBEIRO *et al.*, 2015). A sua ocorrência natural, alta especificidade de hospedeiro infectando poucas ou uma única espécie e a presença de estruturas de proteção (cristais proteicos) contra adversidades ambientais são características que permitem a formulação de bioinseticidas com tecnologia de fácil aplicação, representando economia e biossegurança para a agricultura (SOSA-GOMEZ *et al.*, 2020). Os estudos com baculovírus também tem contribuído para a produção de inseticidas virais geneticamente modificados, aprimorando suas características patogênicas e amplificando seu espectro de hospedeiro (ROHRMANN, 2020).

Diante da tendência em reduzir os investimentos e consumo de inseticidas químicos, devido às pressões sociais para a conservação ambiental e a manifestação de resistência de alguns insetos, muitas espécies de baculovírus foram estudadas ao longo dos anos (SUMMERS, 2006). A espécie tipo *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (cujo acrônimo para o isolado é AgMNPV) foi aplicado nas décadas de 1970-1980 para o biocontrole da praga da soja *Anticarsia gemmatalis* (MOSCARDI, 1999; SOSA-GÓMES, 2017), fazendo parte do maior controle biológico do mundo utilizando um vírus dessa espécie. O sucesso do programa no Brasil permitiu o uso do AgMNPV em outros países da América do Sul, incluindo Argentina, Bolívia, México e Paraguai (SOSA-GÓMES *et al.*, 2008; SOSA-GÓMES, 2017).

Baculovírus infectivos para insetos membros do gênero *Spodoptera* são bastante utilizados

como agentes de controle biológico mundo afora. Países como Argentina, Brasil, Colômbia, Honduras, México, Peru e Venezuela avaliaram a eficácia de variantes geográficas de SfMNPV em campo e em laboratório contra populações locais de *S. frugiperda* (HAASE *et al.*, 2015). No Brasil, um isolado natural de SfMNPV tem sido utilizado para controlar o inseto no milho, o inseticida é obtido das lagartas criadas com uma dieta artificial e processado como um pó molhável a ser aplicado contra lagartas de primeiro e segundo instar. O vírus SfMNPV foi usado em aproximadamente 5.000 a 10.000 ha por ano até 1995, expandindo para 20.000 ha por ano (MOSCARDI, 1999). Existem também relatos de estudos avaliando a variação genética das populações naturais de *Spodoptera exempta* nucleopolídeo vírus (SpexNPV) para posterior implementação de seu uso no controle da lagarta *Spodoptera exempta* (Walker) em países do continente africano (REDMAN *et al.*, 2010). Na Tailândia, um baculovírus isolado de *S. exigua* é produzido em laboratório afim de ser distribuído aos agricultores para posterior produção em campo do vírus (ROVESTI, 1992). Outro isolado de *S. exigua* foi desenvolvido nos Estados Unidos pelas empresas Crop Genetics International (CGI) e a DuPont de 1992 a 1994. Em 1994, a CGI começou a vender SPOD-X™ para controle do inseto em flores e plantas ornamentais. Em 1995 a CGI fundiu-se com a Biosys, e a SPOD-X foi introduzida nos Estados Unidos para o controle de *S. exigua* em plantações de algodão e hortaliças (MOSCARDI, 1999). Em 1988 outro vírus foi utilizado para controlar a lagarta da beterraba *S. exigua*, uma vez que estudos haviam relatado eficácia apenas para o primeiro instar da praga, demonstrando que as dosagens virais deveriam ser ajustadas de acordo com os instares para efetivo controle (SMITHS & VLAK, 1988). Existem relatos que o isolado *Spodoptera ochrea* nucleopolyhedrovirus (SpocNPV) demonstrou ser capaz de controlar insetos da espécie *S. eridania* em plantações de batata e tomate em regiões do Peru, com uma redução de 78% nas populações de *S. eridania* que parasitam as culturas (ZEDDAM *et al.*, 1999).

O interesse pelo controle biológico a base baculovírus no Brasil cresceu após o surto da praga exótica identificada em fevereiro de 2013, *H. armigera*. Os resultados positivos do uso de formulados importados para o controle de pragas nesse período encorajaram o uso desses e outros agentes, e consequentemente, diversos formulados a base de baculovírus foram registrados no Ministério da Agricultura (ou submetidos a registro) em 2018 para o controle de espécies de lepidópteros. Dentre esses registros estão formulados para o controle de pragas da soja como *A. gemmatilis* e *C. includens* utilizando o baculovírus AgMNPV e ChinSNPV fornecidos pelas empresas Bosquioli & Santos, Agrocete, Andermatt, Novozymes e Agbitech.

Para a mariposa do Álamo *C. vestigialis* utilizando a espécie CoveNPV fornecido pela empresa Bosquioli & Santos. Os formulados para o controle das pragas de hábito polífago *H. armigera* utilizando os baculovírus AcMNPV, HzSNPV e HearNPV e *S. frugiperda* com SfMNPV fornecidos pelas empresas Agbitech, Certis (importer Iharabras S/A), Koppert do Brasil, VR Biotech e Simbiose. E duas formulações contendo uma mistura de duas espécies de baculovírus HzSNPV e ChinSNPV para o controle de *H. zea*, *H. armigera*, *Chloridea virescens* e *C. includens* fornecidas pela empresa Agbitech (SOSA-GOMEZ *et al.*, 2020). Apenas alguns desses produtos são produzidos localmente pelas empresas no país e até então só existe o registro de uma única formulação a base de baculovírus para o controle de uma espécie do gênero *Spodoptera* no Brasil.

## 2.7 SULFATO DE CONDROITINA, *condroitina liases* e *odv-e66*

Vírus são parasitas obrigatórios e dependem de uma variedade de funções para estabelecer-se com sucesso nas células do hospedeiro e, assim replicar-se. Para uma infecção produtiva, as estruturas celulares e as vias moleculares devem ser compatíveis para favorecer todos os eventos da infecção, desde a fixação e entrada, até a replicação, montagem e egresso. Portanto, os vírus desenvolveram mecanismos para manipular a fisiologia do hospedeiro para penetrar suas barreiras orgânicas e celulares. Estudos sobre relações vírus-hospedeiro durante os processos infectivos proporcionaram percepções únicas sobre mecanismos e funções celulares. Em baculovírus, vários genes caracterizados fornecem meios de manipular o inseto afim de favorecer a sua replicação. Genes como EGT, Enhancinas, Serpinas, inibidores de caspases (p35 e p49) e inibidores de apoptose (IAPs) são alguns exemplos desses mecanismos que se opõem às defesas imunológicas do hospedeiro e aumentam a eficiência da infecção (THIEM, 2009; ROHRMANN, 2020).

Foi identificado um gene homólogo de *condroitina liase* em baculovírus chamado de *odv-e66* (Ac46). Este gene conservado na grande maioria dos baculovírus que infectam lepidopteros e em alguns genomas presente em duas cópias, é a única condroitinase viral conhecida, derivada de homólogos de bactérias, hymenopteros e outros vírus de DNA dupla fita circular que infectam insetos. A proteína de envelope do vírus derivado de oclusão 66 (*odv-e66*) está localizada dentro do envelope do ODV e apresenta atividade como condroitina liase (BRAUNAGEL & SUMMERS, 2007). A proteína é considerada um fator *per os* de

infecciosidade, essencial para a infecção oral do vírus, permitindo a penetração e degradação da matriz extracelular do hospedeiro (PENG *et al.*, 2010).

Sulfato de condroitina (do inglês ‘chondroitin sulfate’ - CS) e sulfato de dermatan (do inglês ‘dermatan sulfate’ - DS) são glicosaminoglicanos lineares, sulfatados e polidispersos, amplamente distribuídos como cadeias laterais de proteoglicanos, compostos por unidades repetidas de dissacarídeos do ácido D-glucopiranosil-urônico (GlcAp) ou um ácido L-idopiranosil-urônico (IdoAp) glicosidicamente ligado ao resíduo 2-desoxi, 2-acetamido-D-galactopiranosose (GalpNAc), frequentemente presente nas membranas celulares e na matriz extracelular de todos os tecidos. Conhecidos por participar de várias funções fisiológicas como, por exemplo, interações com proteínas da matriz, ativação de fatores de crescimento, regulação da angiogênese e invasão e proliferação de células de melanoma, estes glicoaminoglicanos sulfatados são divididos em quatro classes: condroitina; condroitina-4-sulfato (CS-A); sulfato de dermatan (CS-B ou DS) e condroitina-6-sulfato (CS-C)(GANDHI & MANCERA, 2008; LINHARDT *et al.*, 2006; PETIT *et al.*, 2006).

Existe um grande número de mecanismos enzimáticos que evoluíram para degradar glicosaminoglicanos sulfatados, estas enzimas são geralmente classificadas em dois grupos: hidrolases de polissacarídeos (EC 3.2.1.-) e liases de polissacarídeos (PL, EC 4.2.2.-). O primeiro grupo catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas em polissacarídeos neutros e ácidos, enquanto o segundo grupo cliva em ligações glicosídicas de grande maioria (1→4) em polissacarídeos aniônicos. A degradação de glicosaminoglicanos em eucariotos geralmente ocorre pela ação das hidrolases, enquanto as bactérias expressam liases (PETIT *et al.*, 2006).

Liases, enzimas da classe 4 que realizam a clivagem de reações não-hidrolíticas, são subdivididas em três tipos principais de condroitinases (liases que degradam sulfatos de condroitina), dependendo da especificidade do substrato. Estas enzimas são bioquimicamente classificadas em condroitina liase do tipo AC, B e ABC, onde condroitina liase do tipo AC pode degradar condroitina não sulfatada, sulfato de condroitina A e C, condroitina liase do tipo B pode degradar sulfato de dermatan (CS-B ou DS) e condroitina liase do tipo ABC pode degradar todos os sulfatos de condroitina acima citados. (LINHARDT *et al.*, 2006; NELSON & COX., 2018)

As condroitinases estão presentes em diversos organismos, variando de bacteriófagos e Arquéias, a bactérias e eucariontes superiores, como fungos, algas, plantas e mamíferos. Em bactérias patogênicas, as condroitinases são conhecidas por facilitar o acesso a célula alvo

através da degradação da condroitina presente na matriz extracelular (LOMBARD *et al.*, 2010; KAWAGUCHI *et al.*, 2013).

A cristalografia da ODV-E66 de AcMNPV mostrou que a proteína possui similaridade estrutural com enzimas da família de polissacarídeo liase 8 (PL8) de bactérias, apresentando conservação dos domínios envolvidos na catálise, sugerindo a hipótese de uma transferência horizontal de genes de bactéria durante a infecção em insetos. Por ser substrato específica, a função enzimática desta proteína é semelhante a condroitinase do tipo AC, capaz de degradar condroitinas não-sulfatadas e sulfatos de condroitina C, porém com excessão de degradar sulfato de condroitina A (KAWAGUCHI *et al.*, 2013). Essa individualidade reflete a especificidade do hospedeiro, uma vez que a membrana peritrófica do mesmo possui baixas quantidades de sulfato de condroitina A. Tornando *odv-e66* um gene importante (mas não crucial) para infecção oral de baculovírus (ROHRMANN, 2020).

## 2.8 O SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS DE BACULOVÍRUS

Desde a publicação do primeiro genoma humano sequenciado, a compreensão sobre o funcionamento do corpo humano, bem como a de patologia associadas mudou drasticamente. Da mesma forma, para outros organismos não-humanos, grandes projetos que visam a análise sistemática de genomas estão moldando conhecimentos sobre variação genética presente nas populações de patógenos, a diversidade de microrganismos presentes em nosso ambiente e as mudanças genéticas por trás de doenças. Conquistas nas áreas científicas, médicas e de saúde pública nos últimos séculos, como vacinação e terapias antivirais, proporcionaram o controle de diversas doenças infecciosas. Entretanto, durante as últimas três décadas, testemunhamos vários surtos de doenças virais emergentes e reemergentes, com graves impactos no sistema de saúde de países desenvolvidos e em desenvolvimento. A identificação e compreensão da dinâmica de vírus em circulação na população humana tornou-se prioridade internacional, envolvendo instituições em todo o mundo. Dados genômicos completos de um vírus tem a capacidade de gerar novas informações sobre o patógeno de forma rápida e eficiente, podendo combater de maneira eficaz a disseminação durante surtos virais através da vigilância constante e auxiliando no desenvolvimento de novos diagnósticos, drogas antivirais e vacinas aprimoradas (DIKENG & SPIRO., 2009; HOULDCROFT *et al.*, 2017). O exemplo mais atual disso é a pandemia do novo coronavírus (SARS-CoV-2) descoberto no final de dezembro de

2019, em Wuhan, Província de Hubei, China, em pacientes com sintoma de pneumonia. Onde os dados provenientes do sequenciamento determinaram que o vírus se tratava de um novo *Betacoronavirus*, que seu hospedeiro original era o morcego, porém um hospedeiro intermediário, provavelmente um animal vendido no mercado de frutos do mar de Wuhan, foi o vetor que facilitou a infecção em humanos, e também foi sugerido um possível mecanismo de entrada do vírus na célula hospedeira humana (LU *et al.*, 2020). Estas informações são fundamentais para compreensão e combate desta nova doença.

O sequenciamento de genomas completos é a base para o início de quaisquer estudos moleculares mais detalhados de isolados ou de novas espécies virais e sua aplicabilidade se estende por diversas áreas. Estudos relacionados a família *Baculoviridae*, bem como a caracterização estrutural, genômica e proteômica viral, entendimento de mecanismos patológicos do inseto e a célula hospedeira só foram possíveis através do avanço de tecnologias de sequenciamento de alto desempenho. Os dados gerados influenciaram diretamente no uso de baculovírus como agentes de controle biológicos, permitindo a realização de análises de estabilidade genética de isolados temporais ou mutações associadas à perda ou ganho de virulência, bem como seu melhoramento como vetor de expressão heteróloga (ARDISSON-ARAÚJO, 2015).

Até a presente data existem 259 genomas de baculovírus sequenciados disponíveis no banco de dados de nucleotídeos do NLM/NCBI 'GenBank', 84 são reconhecidos como espécies virais pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV) e estão divididos de acordo com os quatro gêneros da família viral, *Alphabaculovirus* (55 espécies), *Betabaculovirus* (26 espécies), *Gammabaculovirus* (2 espécies) e *Deltabaculovirus* (1 espécie). Genomas de baculovírus infectivos para o gênero *Spodoptera* reconhecidos pelo ICTV são oito: *Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus*, *Spodoptera exempta nucleopolyhedrovirus*, *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*, *Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus*, *Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus* (pertencente ao gênero *Alphabaculovirus*), e *Spodoptera frugiperda granulovirus* e *Spodoptera litura granulovirus* (pertencentes ao gênero *Betabaculovirus*) (ICTV, 2019).

Em um estudo recentemente publicado (HARRISON & HOWLEY, 2019), um baculovírus isolado da lagarta *S. eridania* foi sequenciado, caracterizado e é reconhecido como uma nova espécie dentro da família *Baculoviridae*, porém nenhum ensaio biológico foi realizado para testar a sua patogenicidade e de acordo com a porcentagem de identidade do genoma



mais proximamente relacionado, esse vírus é relacionado com o isolado *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus II.

Nesta dissertação, foi sequenciado e caracterizado o genoma completo de um baculovírus isolado da espécie *S. eridania*, aqui chamado *Spodoptera eridania* nucleopolyhedrovirus isolado CNPSo-165 (SperNPV-CNPSo-165). O vírus foi encontrado em extratos de *S. eridania* com sintomas de infecção por baculovírus obtidos da coleção de vírus da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) localizada em Londrina-PR e através do sequenciamento do genoma completo e outras análises *in silico*, descobriu-se que o vírus representa um membro de uma nova espécie putativa dentro do gênero *Alphabaculovirus*. Além disso, esse novo vírus contém uma única cópia do gene homólogo de *odv-e66* em seu genoma.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar em nível estrutural, biológico e molecular um baculovírus isolado da espécie praga *Spodoptera eridania* afim de entender a interação vírus-hospedeiro, seu contexto evolutivo e contribuir com o desenvolvimento de um agente biológico efetivo para o controle de pragas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

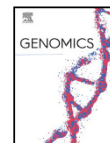
- Extrair e purificar os OBs e o DNA viral presente no extrato da lagarta *S. eridania* da coleção de vírus da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (Embrapa);
- Realizar a caracterização ultraestrutural do vírus por microscopia eletrônica de varredura e transmissão;
- Realizar bioensaio de infecção afim de analisar se o vírus é realmente infectivo para lagartas de *S. eridania*;
- Realizar bioensaio de infecção a fim de analisar se o vírus também é infectivo para lagartas de *S. albula* e *S. frugiperda*;
- Sequenciar por pirosequenciamento 454 (Roche) e descrever o genoma completo do baculovírus isolado da lagarta *S. eridania*, aqui denominado *Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus* isolado CNPSo 165 (SperNPV-CNPSo-165);
- Descrever, caracterizar *in silico*, identificar e anotar todas as ORFs encontradas no genoma de SperNPV-CNPSo-165 por BLASTX e HMMER;
- Estabelecer a identidade nucleotídica dos genes encontrados com outros baculovírus proximamente relacionados;
- Estabelecer as relações filogenéticas da nova espécie de baculovírus com as demais espécies já descritas;
- Analisar peculiaridades do genoma de SperNPV-CNPSo-165 como a presença de ORFs únicas, a identidade e sintenia dos genes encontrados com outros baculovírus de espécies virais relacionadas;

- Aplicar o critério de demarcação de novas espécies a fim de descobrir se SperNPV-CNPSO-165 é uma nova espécie dentro da família *Baculoviridae*;
- Caracterizar o gene da condroitina-liase viral *odv-e66* e relatar a história evolutiva desse gene nunca antes estudado.

## 4 RESULTADOS

A metodologia, os resultados e a discussão inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito científico. O manuscrito foi publicado na revista *Genomics*.

RODRIGUES, Daniela T. *et al.* Characterization of a novel alphabaculovirus isolated from the Southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) and the evolution of *odv-e66*, a bacterium-acquired baculoviral chondroitinase gene. *Genomics*, 2020.



## Characterization of a novel alphabaculovirus isolated from the Southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) and the evolution of *odv-e66*, a bacterium-acquired baculoviral chondroitinase gene



Daniela T. Rodrigues<sup>a</sup>, Lenen Peterson<sup>a</sup>, Lucas Boeni de Oliveira<sup>a</sup>, Daniel R. Sosa-Gómez<sup>b</sup>, Bergmann Morais Ribeiro<sup>c</sup>, Daniel M.P. Ardisson-Araújo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Insect Virology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Baculovirus, Cell Biology Department, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Baculovirus  
*Spodoptera eridania*  
Alphabaculovirus  
Evolution  
*odv-e66*

### ABSTRACT

The Southern armyworm *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) is native to the American tropics and a polyphagous pest of several crops. Here we characterized a novel alphabaculovirus isolated from *S. eridania*, isolate *Spodoptera eridania* nucleopolyhedrovirus CNPSo-165 (SperNPV-CNPSo-165). SperNPV-CNPSo-165 occlusion bodies were found to be polyhedral and to contain virions with multiple nucleocapsids. The virus was lethal to *S. eridania* and *S. albula* but not to *S. frugiperda*. The SperNPV-CNPSo-165 genome was 137,373 bp in size with a G + C content of 42.8%. We annotated 151 ORFs with 16 ORFs unique among baculoviruses. Phylogenetic inference indicated that this virus was closely related to the most recent common ancestor of other *Spodoptera*-isolated viruses.

### 1. Introduction

The Southern armyworm *S. eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) is a moth native to the American tropics [1] with larvae that are extensively polyphagous [2]. In Brazil, *S. eridania* has become a pest of expanding importance in crops of soybean, cotton, fruits, and weeds [3–6] due to both tolerance to high density population and a high degree of defoliation caused by feeding larvae [5,7]. The use of broad-spectrum chemical insecticides is the main method to control *S. eridania* [8], which can lead to selection of resistant pests and death of non-target organisms (e.g. natural enemies, pollinators, and soil arthropods). Moreover, as xenobiotics, chemical insecticides may cause bioaccumulation and intoxication of human and other vertebrate animals [9].

Methods using biocontrol agents, like insect viruses, are important options to complement or even replace pesticides in an integrated pest management program [10,11]. Among the insect viruses found in nature, members of family *Baculoviridae* have been used as effective biopesticides [10]. For example, isolate 2D of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) has been applied since early 1980s for biocontrol of the soybean pest *Anticarsia gemmatalis* in

Brazil [12]. The success of the program in Brazil allowed the use of AgMNPV-2D in other countries of South America, including Argentina, Bolivia, Mexico, and Paraguay [12,13]. The family *Baculoviridae* contains a diverse group of insect-specific viruses with circular double-strand DNA genome, whose sizes range from 80 to 180 kbp and code for 90–180 genes [14]. The family is currently divided into four genera: *Alphabaculovirus* and *Betabaculovirus* that contain members infectious to larvae of lepidopterans (caterpillars of butterflies and moths), *Gammabaculovirus* that contains members infectious to larvae of hymenoptera (specifically sawflies, wasps with caterpillar-like behavior), and *Deltabaculovirus* that contains members infectious to larvae of dipterans (specifically mosquitoes) [14,15]. A hallmark feature of baculovirus infection is the assembly of virions into occlusion bodies (OBs), which protect the virions from environmental adversities [16]. The viral infection begins when the host feeds on substrates contaminated with OBs. Two viral phenotypes are produced during the complete infection cycle. The occlusion-derived virus (ODV), which is responsible for the primary infection, is released in the insect midgut after dissolution of the OBs and infects the midgut epithelium cells. Then, the infected cell produces the budded virus (BV), which is

\* Corresponding author.

E-mail address: [daniel.araujo@ufsm.br](mailto:daniel.araujo@ufsm.br) (D.M.P. Ardisson-Araújo).

<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.06.047>

Received 14 February 2020; Received in revised form 24 May 2020; Accepted 28 June 2020

Available online 03 July 2020

0888-7543/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

responsible for secondary infection and spreads the viral disease from the midgut throughout the insect body [15,17]. At the end of the infection, the larvae exhibit a weakened, melanized tegument and an internal anatomy, which has been largely liquefied [18].

In a published study [19] a baculovirus isolated from the caterpillar *S. eridania* (Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus isolate 251, or SpermNPV-251) was sequenced and characterized, but according to the phylogeny and parameters of species demarcation, this virus was related to Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus II (SplNPV-II), a representative of an unclassified virus lineage. In this work, we characterized a second baculovirus isolated from the Southern armyworm *S. eridania* at the structural, biological, and molecular levels. The virus was found in larval cadavers of *S. eridania* exhibiting symptoms of baculovirus infection, which were obtained from the virus collection of the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA, 'Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária') and named Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus isolate CNPSO-165 (SpermNPV-CNPSO-165). Ultrastructural and bioassay analysis of the OBs and sequence analysis of the genome were carried out. This virus was found to be distinct from SpermNPV-251 and a representative of a novel tentative species inside *Alphabaculovirus*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Virus sample and purification of OBs

Carcasses of *S. eridania* larvae with symptoms of baculovirus infection found between the cities of Ibiopora and Jataizinho (State of Parana, Brazil) were sent to EMBRAPA in March 2011, and kept at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the purification of the OBs [20]. The insect cadavers were homogenized with an equivalent volume of ddH<sub>2</sub>O (*w/v*), filtered through cotton gauze, and centrifuged at  $5000\times g$  for 10 min. The supernatant was discarded, and the pellet was suspended in the same volume of 0.5% SDS, and centrifuged at  $5000\times g$  for 10 min. The washing step was repeated three more times. The pellet was suspended in 0.5 M NaCl, centrifuged at  $5000\times g$  for 10 min and suspended in 2 ml ddH<sub>2</sub>O. OBs were loaded onto a sucrose gradient (40–65%), centrifuged at  $130,000\times g$  for 3 h. OBs were collected as a band and diluted five times with ddH<sub>2</sub>O. The suspension were collected by centrifugation at  $7000\times g$  for 10 min, diluted in ddH<sub>2</sub>O ( $10^6$  OBs / ml ddH<sub>2</sub>O), and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  [20,21].

### 2.2. Electron microscopy

For SEM and TEM analysis, 100  $\mu\text{l}$  of the OB-containing suspension at a concentration of  $10^9$  OBs/mL ddH<sub>2</sub>O were used for preparation according to previously published protocols [22]. For SEM, OBs ( $10^9$  OBs/ml) were treated with acetone 1 X and then incubated at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 h. The solution was loaded onto a metallic stub, dried overnight at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , coated with gold in a Sputter Coater (Balzers) for 3 min, and observed in a SEM Jeol JSM 840A at 10 kV. For TEM, pellets of purified OBs were fixed in Karnovsky fixative (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, in 0.1 M, pH 7.2, cacodylate buffer) for 2 h, post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h and then stained en bloc with 0.5% aqueous uranyl acetate, dehydrated in acetone, and embedded in Spurr's low viscosity embedding medium. The ultrathin sections were stained with uranyl acetate/lead citrate and observed in a TEM Jeol 1011 at 80 kV. Nucleocapsids were counted from five independent fields.

### 2.3. Viral DNA purification, genome sequence, assembly, and annotation

Viral DNA was purified from 200  $\mu\text{l}$  of the OB-containing suspension ( $10^{10}$  OBs/mL of ddH<sub>2</sub>O) according to previous protocols [21]. The viral genome was sequenced with the 454 Genome Sequencer (GS-FLX) Titanium. The reads were trimmed and used for the *de novo* assembly method in the software Geneious R9 [23] with a minimum pairwise

identity of 98.4%. The open reading frames (ORFs) that started with a methionine codon (ATG) and encoded polypeptides of at least 50 amino acids were annotated using the same software and BLAST-X [24]. In order to identify homologous regions (*hrs*) present in the genome, DOTPLOT and Tandem Repeat Finder searches were performed using the Geneious R9 program to analyze the composition of the repeat region. The genomic DNA sequence was submitted to GenBank under the accession number MT040195.

### 2.4. Baculovirus phylogeny and species demarcation criterion

For phylogenetic analysis of baculoviruses, the MAFFT alignment [25] was carried out upon the nucleotide sequence of the 38 baculoviral core genes obtained from 93 baculovirus genomes (Supplementary Table 1). Afterwards, the alignments were concatenated and used to infer a maximum likelihood tree by using the Fast-tree method [26] and a Shimodaira-Hasegawa-like test [27]. To verify whether this virus corresponds to a new species, the nucleotide distances was estimated using the adjusted Kimura-2 parameter from partial sequences of three conserved baculovirus genes, including *lef-8*, *lef-9* and *polyhedrin* [28].

### 2.5. Gene content analyses

Each ORF found in the genome sequence was submitted individually to BLASTX [24] in order to find the identity to other baculoviruses. The ORFs with no BLAST matches were submitted to HHpred and SMART [29,30] to search for conserved domains. Moreover, the complete genome of the novel virus was compared to other alphabaculoviruses through the construction of syntenic maps using the progressive Mauve algorithm implemented in the software Geneious R9 [23]. In order to compare the gene content of the SpermNPV-CNPSO-165 genome and other related baculoviruses, the genomes of several *Spodoptera*-isolated alphabaculoviruses were re-annotated according to the same criteria used for the novel virus and constructed a Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) to represent the number of ORFs shared between SpermNPV-CNPSO-165 and the closest relatives.

### 2.6. In silico characterization of the baculovirus odv-e66 gene

A homolog of the baculoviral chondroitinase gene *odv-e66* was identified in the SpermNPV-CNPSO-165 genome (SpermNPV-ORF-124). To understand the evolution and acquisition of the *odv-e66* gene, the genome context was evaluated in relation to the genome of closely related species for each homolog found. Phylogenetic analyses based on the predicted amino acid sequence of *odv-e66* were performed using sequences retrieved from the BLASTX. The sequences were aligned by the MAFFT method [25] and the alignment used for phylogenetic inference with the PHYML method [31] under the substitution models LG + G (2.11). The optimal model was predicted by the MEGA7 software [32].

### 2.7. Insects and bioassays

*S. eridania*, *S. frugiperda*, and *S. albula* caterpillars used in this work were obtained from laboratory colonies established in 2015 with insects collected in the city of Londrina (Parana, Brazil). As previously described, early third-instar caterpillars were fed *ad libitum* by an artificial diet contaminated with the virus [33,34]. The insects were kept at  $26 \pm 1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with relative humidity of  $75 \pm 10\%$  and photoperiod of 14:10 (L:D). The assays with *S. eridania* were performed in triplicate using six virus concentrations ( $n = 45$  per concentration)  $2.0 \times 10^3$ ,  $6.0 \times 10^3$ ,  $18.00 \times 10^3$ ,  $54.00 \times 10^3$ ,  $162.00 \times 10^3$ , and  $486.00 \times 10^3$  OBs/ml and an untreated group ( $n = 44$ ) was set up as control. The *S. frugiperda* caterpillar assays were performed using five virus concentrations ( $n = 30$  insects per concentration)  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  and  $1 \times 10^2$  OBs/mL and an untreated group ( $n = 40$ ) was set up as control. The *S. albula* caterpillar assays

were performed using five virus concentrations ( $n = 20$  insects per concentration)  $5 \times 10^3$ ,  $2.5 \times 10^3$ ,  $1.25 \times 10^3$ ,  $0.62 \times 10^3$  and  $0.31 \times 10^3$  OBs/mL and an untreated group ( $n = 20$ ) established as control. Mortality was determined after 12 days. The results were analyzed by Probit in PoloPlus version 1.0. The LC50s were considered significantly different based on the non-overlap of the 95% confidence limits.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Virus isolation and OBs ultrastructure

In 2011, dead *S. eridania* larvae were collected in soybean crops with clear symptoms of baculovirus infection, including tree top disease behavior and tegument discoloration and liquefaction (data not shown). The virus was catalogued in the EMBRAPA virus collection and called *Spodoptera eridania* NPV isolate CNPSO-165 (SperNPV-CNPSO-165). Ultrastructural analysis of purified OBs by SEM showed OBs with a predominantly polyhedral shape (Fig. 1A). The OB size was a mean diameter of  $2.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$ . TEM analysis showed OBs occluding virions with several nucleocapsids per envelope, with a mean of  $5.8 \pm 2.6$  nucleocapsids/envelope (Fig. 1B). The calyx, an electron-dense structure that surrounds mature polyhedra, was also observed (Fig. 1B, black arrow). All structures observed were similar to those observed previously in other alphabaculovirus OBs [35–37].

#### 3.2. Virus etiology confirmation and bioassays

To confirm the infection etiology, we carried out a dose-mortality response bioassay in a laboratory colony of *S. eridania*. We confirmed that the

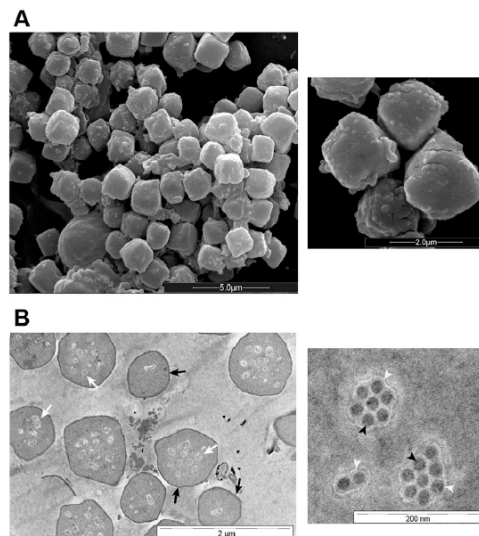


Fig. 1. Characterization of the SperNPV-CNPSO-165 isolate from dead Southern armyworm larvae with symptoms of baculovirus infection. (A) Scanning electron micrograph of SperNPV-CNPSO-165 OBs reveals their polyhedral shape (scale bar =  $5.0 \mu\text{m}$  and  $2.0 \mu\text{m}$ ). (B) Transmission electron micrograph of SperNPV-CNPSO-165 OBs showing embedded virions (white arrow) with multiple rod-shaped nucleocapsids (black arrowhead) per ODV envelope (white arrowhead). The calyx is pointed by the black arrow (scale bar =  $2.0 \mu\text{m}$  and  $200 \text{nm}$ ).

Table 1

Dose-mortality response of third instar larvae of *Spodoptera eridania* infected orally with SperNPV-CNPSO165.

Species	n <sup>a</sup>	Slope	LC <sub>50</sub>	Fiducial limits
			(OB/ml)	(95%)
<i>S. eridania</i>	315	$1.039 \pm 0.126$	$1.04 \times 10^5$	$7.07 \times 10^2$ – $16.76 \times 10^5$
<i>S. albula</i>	200	$1.360 \pm 0.335$	$7.35 \times 10^2$	$3.66 \times 10^2$ – $11.53 \times 10^2$

<sup>a</sup> Number of insects tested.

virus was lethal to *S. eridania* larvae with a LC<sub>50</sub> of  $1.04 \times 10^5$  OB/mL (Table 1) towards 3rd instar larvae. The infected caterpillars exhibited a yellowish, easily ruptured tegument with melanotic pigment (data not shown) of the sort typically seen with other baculovirus infections [18]. We also tested the ability of SperNPV-CNPSO-165 to kill larvae of other species of the *Spodoptera*-complex, including *S. frugiperda* and *S. albula*. The isolate was not able to orally infect *S. frugiperda*, although was found to be lethal to *S. albula* with a LC<sub>50</sub> of 735 OBs/mL in a much lower OB concentration than that observed for *S. eridania*. It is not clear why *S. albula* is more susceptible to SperNPV-CNPSO-165 OBs than the own *S. eridania*. In Brazil, population of *S. eridania* had become more common than *S. albula* (personal communication). Until now, we did not observe high prevalence of SperNPV in *S. eridania* population (data not shown). Importantly, both species have a very similar size and based on that we could assume that they use the same food amount. The host range of baculovirus may vary according to the viral species isolate; for instance, some isolate may be infectious to more than 20 hosts (e.g. AcMNPV, [38]) whereas others only infect a single host [39]. The ability to kill both *S. eridania* and *S. albula* may reflect the close degree of relatedly between these species [40]. We found statistical difference between the lethal concentrations observed for these two insects.

#### 3.3. Features of the SperNPV-CNPSO-165 genome sequence

Sequencing of the SperNPV-CNPSO-165 produced almost 10,000 reads with a mean size of  $762.8 \pm 214.3$  bp and coverage of  $40 \times$ . The reads were assembled into one single circular genome contig of 137,373 bp in size with a G + C content of 42.8%. The genome is in a range of the genome size and nucleotide distributions reported for other alphabaculoviruses (Supplementary Table 1). 151 ORFs potentially encoding proteins of 50 or more amino acids were identified and annotated (Supplementary Table 2), covering 88.54% of the genome, whereas 11.46% of the genome was found to be intergenic space. Among the annotated genes, we identified the 38 currently defined baculovirus core genes, 26 genes shared between alpha- and betabaculovirus genomes [41], and several auxiliary genes. Interestingly, regarding the intergenic spaces, the genome presented no typical homologous region, besides six direct repeats, four repeat regions, and two short repeats were found. Direct repeats were called dr1–6 and varied from 67 to 148 bp. Most of the drs (dr2–6) consist of only two repeats at the same direction with size varying 32–77 bp (data not shown). Only dr1 consisted of four concatenated repeats of 32 bp long. The repeat regions were called ReapReg1–4 and varied in size from 303 to 1,001 bp (Table 2). While other *Spodoptera* sp. NPVs possess *hrs*, a small number of other baculoviruses (RanuNPV [16], UrprNPV [21], and also betabaculoviruses like ErelGV [42] have been reported not to contain them. We inspected the percentage of both coding regions and intergenic spaces for each of the SperNPV-CNPSO165-related alphabaculovirus genomes and found that the novel virus is one of the three virus with the highest percentage of coding region (Supplementary Table 3).

#### 3.4. Baculovirus phylogeny

We inferred the phylogenetic relationship of SperNPV-CNPSO-165 to other baculoviruses from core gene nucleotide alignments. The

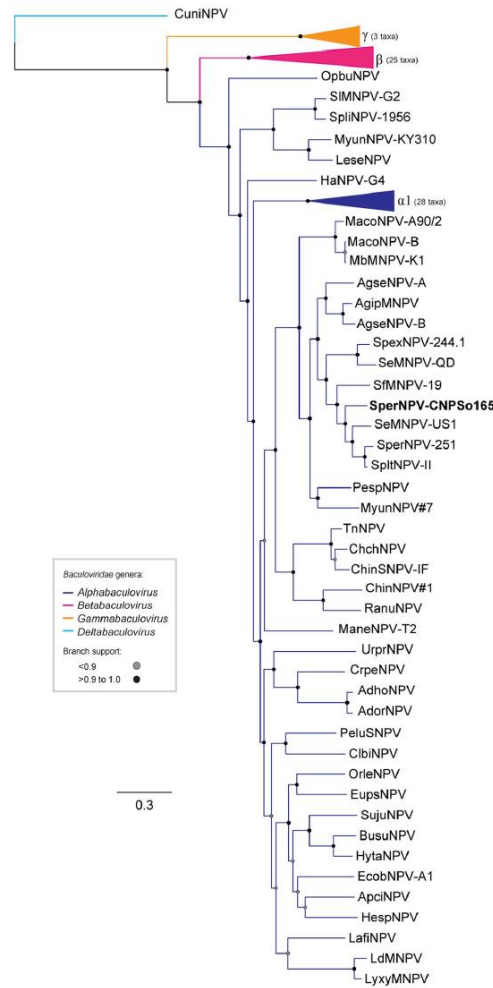


Fig. 2. Baculovirus phylogeny. The phylogeny shows that SpermNPV-CNPSo-165 is an alphabaculovirus closely related to other *Spodoptera*-isolated viruses. The novel virus shares a common ancestor with a branch containing SeMNPV, SpltNPV-II, and SpermNPV-251. The maximum likelihood tree was inferred based on the concatenated nucleotide sequences of the 38 core genes from several selected baculovirus genomes (Table S1) using the FastTree method. The branch support was determined by the SH-like method (black and grey closed circles). Some branches were collapsed for clarity: alphabaculovirus group 1, betabaculovirus (pink), gammabaculovirus (orange), and deltabaculovirus (CuniNPV, light blue). CuniNPV was used to root the tree. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

phylogenetic tree exhibited a topology with a single branch containing all alphabaculoviruses as that observed for other previously published core gene baculovirus trees. SpermNPV-CNPSo-165 clustered in a highly supported clade with SpexNPV-244.1, SeMNPV-QD, SfmNPV-19, SeMNPV, SpltNPV-II, and SpermNPV-251. These viruses are part of a

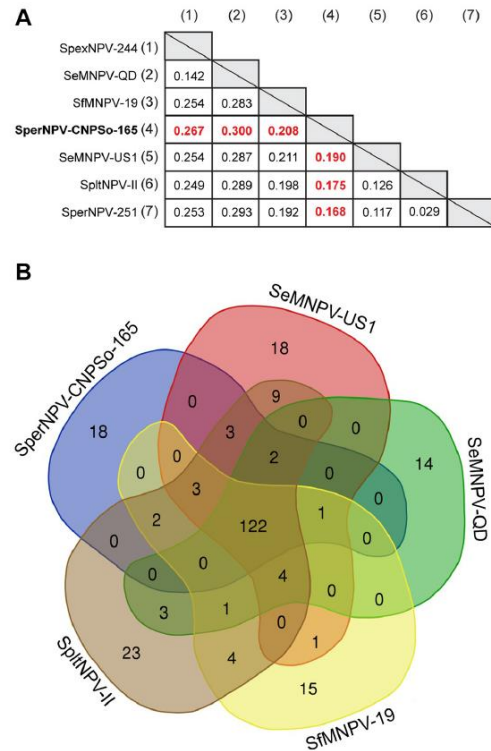


Fig. 3. Species demarcation criterion with the adjusted Kimura-2 parameter (aK2P) and gene content analysis of SpermNPV-CNPSo-165 and other closely related viruses. (A) aK2P based on the concatenated fragments of partial polh/lef-8/lef-9 of the SpermNPV-CNPSo-165 cluster. The distances were calculated using MEGA (Kimura 2-parameter model) [32], based on the species demarcation criteria [28]. In red, we show SpermNPV-CNPSo-165 values that fulfill the criterion to establish a new species (more than 0.072 substitution/site). (B) Venn diagram comparing the gene content among SpermNPV-CNPSo-165 and its closest relatives (SeMNPV-US1, SeMNPV-QD, SfmNPV-19, and SpltNPV-II). The gene content was compared by BLASTX to find homologs. A total of 243 genes were found: 122 were shared among all four virus genomes, and 16 were found only in the SpermNPV-CNPSo-165 genome. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

group of alphabaculovirus isolated solely from noctuid hosts. The SpermNPV-CNPSo-165 isolate is closely related to the most recent common ancestor (m.r.c.a.) of the SeMNPV and SpltNPV-II viruses (Fig. 2). The most closely related alphabaculovirus to SpermNPV-CNPSo-165, based on the nucleotide pairwise identity among the core genes, was found to be SeMNPV-US1 with 77.8% of identity, whereas the most distant alphabaculovirus was EppoNPV with 48.1% identity (Supplementary Table 1).

3.5. Species demarcation criteria

We investigated whether SpermNPV-CNPSo-165 is a representative member of a new species inside genus *Alphabaculovirus*. Comparative analysis using the adjusted Kimura-2-parameter (aK2P) substitution



Table 2

Gene content and BLAST. Characteristics of the Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus isolate CNPSo165 (SperNPV-CNPSo165) genome: number, position, nucleotide and amino acid size of each ORF and homology search. Predicted ORFs are compared with homolog genes in four related genomes: Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus II (SpltNPV-II), Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV-US1), Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus isolate 19 (SMNPV-19), and Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus isolate QD (SeMNPV-QD) and also Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus clone C6 (AcMNPV-C6).

ORF	Name	Position	Size (nt)	Size (aa)	SeMNPV-US1		SeMNPV-QD		SMNPV-19		SpltNPV-II		AcMNPV		
					ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	
1	<i>polyhedrin</i>	1	> 741	741	247	1	97.6	1	94.72	1	97.15	1	97.56	8	85.95
2	<i>pp78/83</i>	820	< 2215	1396	465	2	64.79	2	61.19	2	65.99	2	78	9	27.93
3	<i>pk-1</i>	2271	< 3103	833	278	3	84.39	3	74.55	3	75.94	3	90.23	10	42.54
4	<i>hour</i>	3144	< 5,42	2277	759	4	76.25	4	52.30	4	50.85	4	77.91	-	-
-	<i>Direct region 1</i>	-	-	135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>ac152-like</i>	5785	> 6,09	306	102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>sperNPV-ORF-6</i>	6221	> 7924	1704	568	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	<i>Direct region 2</i>	-	-	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	<i>Direct region 3</i>	-	-	126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>odv-e56(pif-5)</i>	8161	> 9282	1122	374	6	84.70	5	63.17	8	68.28	7	82.53	148	48.69
8	<i>me53</i>	9529	> 10,635	1107	369	7	75.72	6	60.12	9	67.43	8	80.06	139	25.22
9	<i>SperNPV-ORF-9</i>	11,143	> 11,292	150	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	<i>Direct region 4</i>	-	-	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	<i>Repeat region 1</i>	-	-	303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>SperNPV-ORF-10</i>	12,151	> 12,303	153	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>f protein</i>	12,498	> 14,54	2043	681	8	87.21	7	63.12	11	73.44	10	83.03	23	24.73
12	<i>gp16</i>	14,646	< 14,936	291	97	9	83.52	8	61.29	12	65.26	11	87.50	130	31.46
13	<i>p24</i>	14,981	< 15,625	645	215	10	76.99	9	69.81	13	73.58	12	79.26	129	32.54
14	<i>SperNPV-ORF-14</i>	15,822	> 16,103	282	94	11	60.75	10	72.22	14	61.76	13	94.12	-	-
15	<i>lef-2</i>	16,066	> 16,707	642	214	12	76.06	11	61.21	15	64.93	14	79.62	6	40.09
16	<i>38.7 kDa</i>	16,749	> 17,891	1143	381	13	70.36	12	56.85	16	62.40	15	70.65	13	26.86
17	<i>lef-1</i>	17,891	< 18,541	651	217	14	79.63	13	64.11	17	64.62	16	78.24	14	43.98
18	<i>SperNPV-ORF-18</i>	18,585	> 19,016	432	144	15	73.23	14	48.31	18	57.36	-	-	-	-
19	<i>cathepsin</i>	19,004	< 20,011	1008	336	16	91.30	15	88.13	19	89.12	17	90.80	127	56.21
20	<i>chitinase</i>	20,061	> 21,773	1713	571	19	86.27	16	84.29	21	82.17	18	89.98	126	64.43
21	<i>SperNPV-ORF-21</i>	21,81	< 22,124	315	105	20	42.11	-	-	-	-	137	34.95	-	-
22	<i>SperNPV-ORF-22</i>	22,09	> 22,272	183	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>SperNPV-ORF-23</i>	22,342	> 22,797	456	152	21	54.67	-	-	-	-	20	57.72	-	-
24	<i>nad-glutamate dehydrogenase</i>	23,205	> 23,495	291	97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	<i>SperNPV-ORF-25</i>	23,659	> 25,008	1,35	450	23a	68.97	-	-	-	-	21	73.56	-	-
26	<i>gp37</i>	25,121	> 25,915	795	265	25	90.38	17	79.51	23	86.29	22	89.84	64	57.98
27	<i>pp-2</i>	25,912	< 26,404	495	165	26	78.79	18	59.35	24	64.38	23	83.44	-	-
28	<i>egt</i>	26,516	> 28,093	1578	526	27	87.67	19	71.60	25	76.18	24	87.24	15	46.46
29	<i>SperNPV-ORF-29</i>	28,147	> 28,323	177	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	<i>SperNPV-ORF-30</i>	28,284	> 28,838	555	185	28	76.19	20	46.99	26	64.13	25	73.08	-	-
31	<i>SperNPV-ORF-31</i>	28,863	> 29,516	654	218	29	61.06	-	-	27	50.46	29	61.61	-	-
32	<i>SperNPV-ORF-32</i>	29,55	< 32,09	2541	847	30	66.32	21	49.76	28	46.11	30	67.87	-	-
33	<i>SperNPV-ORF-33</i>	32,257	> 32,877	621	207	31	61.23	22	41.92	29	60.50	31	66.99	-	-
34	<i>pktp</i>	32,953	< 33,471	519	173	32	64.85	23	66.86	30	66.86	32	70.76	24	26.28
35	<i>SperNPV-ORF-35</i>	33,514	< 33,843	330	110	33	61.61	25	56.76	-	-	33	60.36	-	-
36	<i>arf-1</i>	33,845	< 34,75	906	302	34	67.97	26	43.65	32	53.55	35	60.31	21	24.65
37	<i>pif-2</i>	34,692	> 35,843	1152	384	35	86.02	27	71.17	33	79.57	36	90	22	60.39
38	<i>pif-1</i>	35,961	> 37,475	1515	505	36	71.85	28	50.19	34	65.03	37	74.47	119	47.69
39	<i>ac120-like</i>	37,472	> 37,72	249	83	37	68.35	29	55.74	35	61.25	38	69.01	120	31.58
40	<i>fgf</i>	37,73	< 38,863	1134	378	38	66.08	30	43.95	36	47.12	39	79.89	32	24.65
41	<i>SperNPV-ORF-41</i>	39,092	< 39,214	123	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	<i>SperNPV-ORF-42</i>	39,279	> 39,989	711	237	40	65.13	31	53.65	37	60.34	41	70.89	-	-
43	<i>alk-exo</i>	40,04	< 41,281	1242	414	41	66.59	32	53.30	38	61.95	42	65.62	134	38.27
44	<i>SperNPV-ORF-44</i>	41,836	> 42,015	180	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	<i>SperNPV-ORF-45</i>	42,064	< 42,219	156	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	<i>Repeat region 2</i>	-	-	1002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	<i>SperNPV-ORF-46</i>	42,882	< 43,217	336	112	42	69.23	33	57.80	39	71.43	43	74.77	-	-
47	<i>ac18-like</i>	43,216	> 44,37	1155	385	43	80.26	34	64.06	40	65.49	44	80.16	18	24.48
48	<i>SperNPV-ORF-48</i>	44,417	< 44,809	393	131	44	75.70	35	62.50	41	63.20	45	85.38	-	-
49	<i>rr2</i>	44,937	> 45,878	942	314	45	85.94	36	74.44	-	-	46	87.86	-	-
50	<i>calix, pep</i>	45,942	< 46,925	984	328	46	86.83	37	79.75	44	86.87	47	92.68	131	41.49
51	<i>ac117-like</i>	47,062	< 47,358	297	99	47	73.79	38	59.60	45	52.04	48	71.43	117	34.31
52	<i>sod</i>	47,485	> 47,94	456	152	48	84.78	40	75.50	47	82.24	51	86.49	31	68.71
53	<i>SperNPV-ORF-53</i>	48,131	> 48,49	360	120	49	35.09	-	-	-	-	52	75.38	-	-
54	<i>pif-3</i>	48,595	> 49,161	567	189	50	80.95	41	69.68	48	76.02	53	86.91	115	51.88
55	<i>SperNPV-ORF-55</i>	49,161	> 49,586	426	142	51	74.47	42	34.92	49	56.93	54	74.13	-	-
56	<i>SperNPV-ORF-56</i>	49,698	> 51,2	1503	501	52	74.51	43	54.22	50	62.38	55	71.34	-	-
57	<i>SperNPV-ORF-57</i>	51,238	> 51,918	681	227	53	84.65	44	79.04	51	83.33	56	86.46	-	-
58	<i>nrk1</i>	51,958	< 53,043	1086	362	54	67.13	45	61.62	52	57.42	57	66.76	-	-
59	<i>SperNPV-ORF-59</i>	53,091	< 53,381	291	97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	<i>Direct repeat 5</i>	-	-	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	<i>SperNPV-ORF-60</i>	53,791	> 54,003	213	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	<i>daupase</i>	54,065	> 54,496	432	144	55	87.41	46	77.46	53	66.67	58	85.31	-	-

(continued on next page)

Table 2 (continued)

ORF	Name	Position	Size (nt)	Size (aa)	SeMNPV-US1		SeMNPV-QD		SiMNPV-19		SpitNPV-II		AcMNPV		
					ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	
62	<i>SperNPV-ORF-62</i>	54,674 >	55,327	654	218	–	–	–	–	54	33.97	59	34.74	–	–
63	<i>p13</i>	55,39 >	56,238	849	283	56	83.58	47	74.63	55	82.67	60	84.64	–	–
64	<i>SperNPV-ORF-64</i>	56,262 <	57,031	771	257	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
65	<i>ac108-like</i>	57,129 <	57,464	336	112	58	81.82	49	68.13	57	79.59	62	89.11	108	38.81
66	<i>odv-ec43</i>	57,477 <	58,547	1071	357	59	96.63	50	88.76	58	94.66	63	97.75	109	44.05
67	<i>pfj-7</i>	58,531 <	58,71	180	60	60	94.87	51	74.58	59	83.78	64	83.05	110	44.12
68	<i>vp80</i>	58,707 <	60,368	1662	554	61	62.61	52	55.39	60	68.95	65	63.26	104	23.43
69	<i>p45</i>	60,404 >	61,522	1119	373	62	90.56	53	82.31	61	86.48	66	92.50	103	52.20
70	<i>p12</i>	61,512 >	61,823	312	104	63	74.53	54	76	62	85.53	67	79	102	29.49
71	<i>p40</i>	61,852 >	63,009	1158	386	64	86.67	55	77.60	63	82.08	68	87.57	101	41.71
72	<i>p6.9</i>	63,08 >	63,319	240	80	65	–	56	–	64	–	69	–	100	–
73	<i>lef-5</i>	63,322 <	64,155	834	278	66	88.49	57	78.10	65	85.87	70	91.30	99	49.10
74	<i>38 k</i>	64,054 >	64,953	900	300	67	84.67	58	73.49	66	83.89	71	92.33	98	47.56
75	<i>ac150-like</i>	65,048 >	65,41	363	121	68	54.10	59	39.36	67	36.29	72a	60.98	150	30.43
76	<i>bro-a</i>	65,341 <	66,423	1083	361	–	–	60	33.23	68	56.73	72	70.03	2	41.44
77	<i>pfj-4</i>	66,559 <	67,068	510	170	69	90.34	61	81.07	70	92.41	74	91.12	96	51.46
78	<i>dna helicase</i>	67,037 >	70,714	3678	1226	70	82.90	62	76.55	71	74.38	75	83.58	95	41.89
79	<i>odv-e25</i>	70,789 <	71,439	651	217	71	91.67	63	85.19	72	90.74	76	94.44	94	46.01
80	<i>p18</i>	71,436 <	71,912	477	159	72	82.35	64	82.91	73	75.16	77	84.42	93	48.70
81	<i>p33</i>	71,922 >	72,68	759	253	73	94.84	65	86.51	74	90.87	78	96.43	92	53.28
–	<i>Short repeat 1</i>	–	–	39	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
82	<i>lef-4</i>	73,003 <	74,412	1,41	470	74	73.38	66	64.41	75	75.11	79	75.85	90	44.98
83	<i>vp39</i>	74,411 >	75,391	981	327	75	96.30	67	71.08	76	84.74	80	97.14	89	43.48
84	<i>cg30</i>	75,704 >	76,789	1086	362	76	52.17	68	27.36	77	29.10	81	55.06	88	30.88
–	<i>Direct repeat 6</i>	–	–	66	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
85	<i>vp91</i>	76,894 <	79,29	2397	799	77	69.77	70	62.15	78	67.96	82	72.60	83	39.50
86	<i>ac82-like</i>	79,337 >	79,96	624	208	78	71.01	71	67.30	79	70	83	71.23	82	36.15
87	<i>ac81-like</i>	79,866 >	80,537	672	224	79	91.53	72	75.94	80	84.90	84	95.21	81	61.83
88	<i>gp41</i>	80,506 >	81,495	990	330	80	96.80	73	93.92	81	94.26	85	96.62	80	54.46
89	<i>ac78-like</i>	81,508 >	81,873	366	122	81	58.46	74	67.50	82	63.64	86	66.94	78	74.07
90	<i>vfj-1</i>	81,875 >	82,99	1116	372	82	97.38	75	94.48	83	96.51	87	98.26	77	68.10
91	<i>SperNPV-ORF-91</i>	83,484 <	83,831	348	116	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
92	<i>SperNPV-ORF-92</i>	84,237 <	84,401	165	55	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
93	<i>SperNPV-ORF-93</i>	84,476 >	84,775	300	100	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
94	<i>p26 a</i>	84,859 <	85,608	750	250	87	82.40	76	66.27	85	77.63	90	85.02	136	20.71
95	<i>iap-2</i>	85,636 >	86,574	939	313	88	63.58	77	59.39	86	60.13	91	67.60	71	29.44
96	<i>mtase</i>	86,417 <	87,211	795	265	89	75.37	78	61.17	87	65.15	92	74.18	69	49.34
97	<i>pfj-6</i>	87,258 <	87,656	399	133	90	85.84	79	76.47	88	84.07	93	82.40	68	47.66
98	<i>lef-3</i>	87,709 >	88,848	1,14	380	91	68.06	80	57.92	89	69	94	75.68	67	29.69
99	<i>desmoplakin</i>	88,918 <	91,026	2109	703	92	67.04	81	47.38	90	59.93	95	66.48	66	38.46
100	<i>dna polymerase</i>	91,07 >	94,234	3165	1055	93	80.61	82	74.12	91	76.54	96	81.19	65	45.53
101	<i>ac75-like</i>	94,251 <	94,64	390	130	94	83.72	83	85.27	92	64.04	97	91.47	75	28.89
102	<i>ac76-like</i>	94,651 <	94,908	258	86	95	94.12	84	90.59	93	97.65	98	94.12	76	40
103	<i>SperNPV-ORF-103</i>	95,02 >	95,343	324	108	96	44.64	84b	47.92	94	50.49	99	52.29	–	–
104	<i>lef-9</i>	95,379 <	96,893	1515	505	97	90.80	85	96.97	96	92.06	100	91.24	62	64.61
105	<i>fp-25 k</i>	96,956 >	97,546	591	197	98	95.36	86	91.24	97	94.85	101	95.82	61	62.96
106	<i>p94</i>	97,697 <	99,814	2118	706	99	45.15	87	36.48	98	33.47	102	41.72	134	21.86
107	<i>ac60-like</i>	99,981 >	100,247	267	89	100	86.76	88	73.13	99	86.36	103	88.24	60	46.77
108	<i>ac58/59-like</i>	100,252 >	100,827	576	192	101	91.30	89	90	100	91.43	104	91.30	59	49.09
109	<i>ac57-like</i>	100,82 <	101,374	555	185	102	69.57	90	62.13	101	69.23	105	72.13	57	37.50
110	<i>SperNPV-ORF-110</i>	101,308 >	101,463	156	52	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
111	<i>ac56-like</i>	101,525 <	101,806	282	94	103	60.22	91	47.22	102	50	106	61.22	56	34.62
112	<i>ac55-like</i>	101,724 <	101,981	258	86	104	57.89	92	40.54	103	42.47	107	65.85	55	33.33
113	<i>vp1054</i>	102,087 <	103,115	1029	343	105	81.10	93	72.14	104	71.30	109	85.09	54	42
114	<i>lef-10</i>	102,976 <	103,203	228	76	106	81.67	94	68	105	77.33	110	88	53a	46.67
115	<i>SperNPV-ORF-115</i>	103,187 >	103,393	207	69	107a	73.53	95	55.88	106	63.64	111	73.53	–	–
116	<i>SperNPV-ORF-116</i>	103,412 >	104,422	1011	337	107	71.91	96	49.85	107	55.42	112	68.36	–	–
117	<i>ac53-like</i>	104,429 >	104,845	417	139	108	89.05	97	70.59	108	81.75	113	91.97	53	47.79
118	<i>ac52-like</i>	104,905 >	105,456	552	184	109	76.32	98	50.56	109	53.76	114	66.12	52	22.73
–	<i>Repeat region 3</i>	–	–	426	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
119	<i>SperNPV-ORF-119</i>	106,029 <	106,427	399	133	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
120	<i>iap-3</i>	106,221 >	107,066	846	282	110	57.29	99	42.62	110	43.42	115	61.32	27	26.88
121	<i>hjadp</i>	107,111 <	108,22	1,11	370	111	64.37	100	43.36	111	61.20	116	64.78	51	23.43
122	<i>lef-8</i>	108,328 >	110,985	2658	886	112	87.09	101	79.39	112	86.37	117	89.23	50	61.82
–	<i>Short repeat 2</i>	–	–	39	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
123	<i>ac43-like</i>	111,086 <	111,256	171	57	113	80.49	102	50.98	113	62.50	118	86.27	43	42.55
124	<i>odv-e66</i>	111,266 <	113,184	1,92	640	114	63.91	103	41.97	114	55.22	119	67.33	46	29.03
125	<i>p47</i>	113,223 >	114,431	1209	403	115	84.58	104	75.25	115	83	120	84.83	40	52.61
126	<i>ac112/113-like</i>	114,572 >	115,252	681	227	116	47.56	105 <sup>†</sup>	22	116	34.57	121	40.20	113	61.52
127	<i>ac114-like</i>	115,352 >	115,942	591	197	117 <sup>‡</sup>	50	105 <sup>†</sup>	29	117	35.87	122 <sup>‡</sup>	55	114	30.43
128	<i>SperNPV-ORF-128</i>	116,091 >	116,621	531	177	117 <sup>‡</sup>	27	105 <sup>†</sup>	26	118 <sup>§</sup>	35	122 <sup>‡</sup>	31	–	–
129	<i>nudix</i>	116,674 >	117,402	729	243	118	93.84	106	80.99	118 <sup>§</sup>	88	123	92.74	38	61
130	<i>LEF-11</i>	117,303 >	117,725	423	141	119	72.12	107	67.62	119	72.64	124	74.77	37	34.74

(continued on next page)

Table 2 (continued)

ORF	Name	Position	Size (nt)	Size (aa)	SeMNPV-US1		SeMNPV-QD		SfMNPV-19		SpltNPV-II		AcMNPV		
					ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	ORF	ID (%)	
131	<i>pp31/39 k</i>	117,724 >	118,638	915	305	120	72.60	108	49.51	120	68.16	125	73.25	36	33.11
132	<i>SperNPV-ORF-132</i>	118,706 >	118,987	282	94	121	56.76	109	32.22	121	55.56	126	60.82	–	–
133	<i>SperNPV-ORF-133</i>	119,023 <	119,25	228	76	122	72.86	110	52.11	122	59.70	127	65.67	–	–
134	<i>Ubiquitin</i>	119,251 <	119,508	258	86	123	95.71	111	86.25	123	96.05	128	96.05	35	77.63
135	<i>ac34-like</i>	119,548 >	120,099	552	184	124	77.42	112	67.40	124	73.45	129a	81.41	34	32.98
–	<i>Repeat region 4</i>	–	–	969	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
136	<i>ac26-like</i>	121,309 <	121,695	387	129	125	77.27	113	53.21	125	61.19	129	76.92	26	33.33
137	<i>dbp</i>	121,787 >	122,749	963	321	126	69.72	114	52.84	126	62.85	130	73.83	25	30.32
138	<i>lef-6</i>	122,766 >	123,266	501	167	127	56.08	115	81.08	127	79.45	131	88.31	28	42.65
139	<i>ac29-like</i>	123,308 <	123,568	261	87	128	84.42	116	65.52	128	62.79	132	93.02	29	31.43
140	<i>p26 b</i>	123,711 >	124,517	807	269	129	73.33	117	59.32	129	67.05	133	76.40	136	32.10
141	<i>p10</i>	124,578 >	124,856	279	93	130	86.36	118	75.36	130	78.33	134	86.96	137	32.35
142	<i>p7A (rif-0)</i>	124,947 <	126,899	1953	651	131	84.10	119	67.84	132	77.08	135	87.85	138	57.12
143	<i>SperNPV-ORF-143</i>	127,002 >	127,268	267	89	–	–	–	–	133	32.86	136	86.36	–	–
144	<i>ie-1</i>	127,383 <	129,371	1989	663	132	63.51	120	48.25	134	56.92	139	71.40	141	31.60
145	<i>ac146-like</i>	129,401 >	130,045	645	215	133	70.56	121	45.97	135	61.43	140	69.48	146	32.39
146	<i>ac145-like</i>	130,075 <	130,353	279	93	134	92.39	122	82.02	136	86.52	141	92.94	145	43.53
147	<i>odv-ec27</i>	130,374 <	131,222	849	283	135	92.55	123	86.62	137	90.11	142	93.97	144	54.33
148	<i>odv-e18</i>	131,281 <	131,529	249	83	136	91.46	124	80.23	138	78.31	143	96.34	143	83.33
149	<i>p49</i>	131,54 <	132,922	1383	461	137	92.19	125	89.57	139	93.48	144	95.87	142	50.85
150	<i>ie-0</i>	132,934 <	133,653	720	240	138	84.93	126	66.36	140	72.73	145	84.40	147–0	30.41
151	<i>rri1</i>	133,774 <	136,314	2541	847	139	65.58	127	58.21	141	32.78	146	66.79	–	–

<sup>a</sup> Region with identity with *SperNPV-CNPSO165-ORF128*.

model applied on selected regions of *lef-8*, *lef-9*, and *polh* showed that the *SperNPV-CNPSO-165* fulfills the criterion to establish a novel baculovirus species. A virus isolate may represent a new species if the number of substitution per site is higher than 0.072 [28]. In a previous work, the *Spodoptera eridania* nucleopolyhedrovirus isolate 251 (*SperNPV-251*) was described as isolated from *S. eridania* larvae [19]. The virus sample was deposited in an insect virus collection at the USDA-ARS in October 1974. Importantly, we found that *SperNPV-251* is related to another currently unclassified isolate, *SplNPV-II* that may together represent a novel species. On the other hand, *SperNPV-CNPSO-165* shows a aK2P-based pairwise distance of 0.168 (Fig. 3A). Even being isolated from the same host, *SperNPV-CNPSO-165* was found to present higher global pairwise nucleotide identity with *SeMNPV*, isolated from *S. exigua* than *SperNPV-251* (Supplementary Table 1).

### 3.6. Genomic structure and gene content analysis

For genomic comparison, we carried out a MAUVE analysis among the genome of all closely related *Spodoptera*-infecting alphabaculoviruses (i.e. *SpexNPV-244.1*, *SperNPV-251*, *SeMNPV-US1*, *SeMNPV-QD*, *SfMNPV-19*, and *SplNPV-II*) and we found strict collinearity with no inversions among the genomes (data not shown). A gene content analysis was also performed based on BlastX results. ORF content is shown in Table 2. A gene content comparison was also carried out among the *SperNPV-CNPSO-165* and its closest relatives, including *SeMNPV-US1*, *SeMNPV-QD*, *SfMNPV-19*, and *SplNPV-II* and represented by a Venn diagram (Fig. 3B). A total of 243 different ORFs were found. 122 ORFs were shared among the species, which includes the 38 genes found in all baculovirus genomes. Sixteen ORFs were found only in the *SperNPV-CNPSO-165* genome. Sixteen ORFs (*SperNPV-ORF-6*, *ORF-9*, *ORF-10*, *ORF-22*, *ORF-24*, *ORF-29*, *ORF-41*, *ORF-44*, *ORF-45*, *ORF-59*, *ORF-60*, *ORF-91*, *ORF-92*, *ORF-93*, *ORF-110*, and *ORF-119*) were found to be unique to *SperNPV-CNPSO-165*. Database queries with most of these unique ORFs yielded matches with several non-viral species (Supplementary Table 3) and only three (*SperNPV-ORF-22*, *SperNPV-ORF-44* and *SperNPV-ORF-91*) exhibited no significant similarity with any sequence in a database. *SperNPV-ORF-6*, *ORF-9*, *ORF-22*, *ORF-44*, *ORF-92* and *ORF119* contained transmembrane domains with no predicted signal peptide (Supplementary Table 3). Moreover, some unique ORFs were located within the repeat regions, including *dr2* and *dr3* (*ORF-6*),

*dr4* (*ORF-9*), *dr5* (*ORF-59*) and, repeat region 2 (*ORF-44* and *ORF-45*) (Table 2). ORFs occurring inside repeat regions are generally unstable and can differ significantly from isolate to isolate of the same virus; however, when the individual reads were analyzed, most present the coding sequences stable and we have chosen to annotate them.

### 3.7. The evolution of *odv-e66* in baculovirus

Most noctuid-infecting viruses commonly harbor two copies of *odv-e66*, which encodes an occlusion-derived virus envelope protein, *ODV-E66*. This transmembrane protein is homologous to chondroitinase AC [46] and possesses the ability to degrade non-sulfated chondroitins and chondroitin sulfate C, but not chondroitin sulfate A [42]. The *odv-e66* presents an important role in the penetration of the PM during oral infection by degrading chondroitin and may be related to specificity of baculoviruses [14,42,43].

Unlike other *Spodoptera* spp.-infecting NPVs, *SperNPV-CNPSO-165* only contains a single copy of *odv-e66*. To evaluate the presence, distribution, and evolution of *odv-e66* genes, a BLASTX query was carried out with the *SperNPV-CNPSO-165* sequence. 91 baculovirus sequences were identified, including 71 from alpha- and 20 from betabaculoviruses. An additional 35 sequence matches were identified with e-value less than  $10^{-4}$ . Twenty-four out of 35 were found in members of the polydnavirus genus *Bracovirus*, while an additional five derived from members of the related large DNA virus families *Nudiviridae* and *Hytrosaviridae*. Other sequences were from several species of bacteria and we selected some with active chondroitin lyases. This may indicate a putative HGT from bacteria to large insect dsDNA viruses, as previously postulated [42]. Many pathogenic bacteria (e.g. streptococci) produce extracellular chondroitinase, which are thought to play a role to facilitate the spread of the organism in host tissues [44]. Moreover, several phages are also known to synthesize a bound form of hyaluronidase. It has been suggested that the function of this viral factor allows an easier penetration into the hyaluronan bacterial capsule by the phage and indeed to the cell surface of the host [45]. Interestingly, active site of chondroitin lyases is composed by three conserved residues and are largely described for bacteria [45]. After MAFFT alignment of baculovirus predicted protein sequences and some Bacteria sequences, we found that the active site is maintained in several baculovirus with most of the residues being conserved (Fig. 4, asterisk and

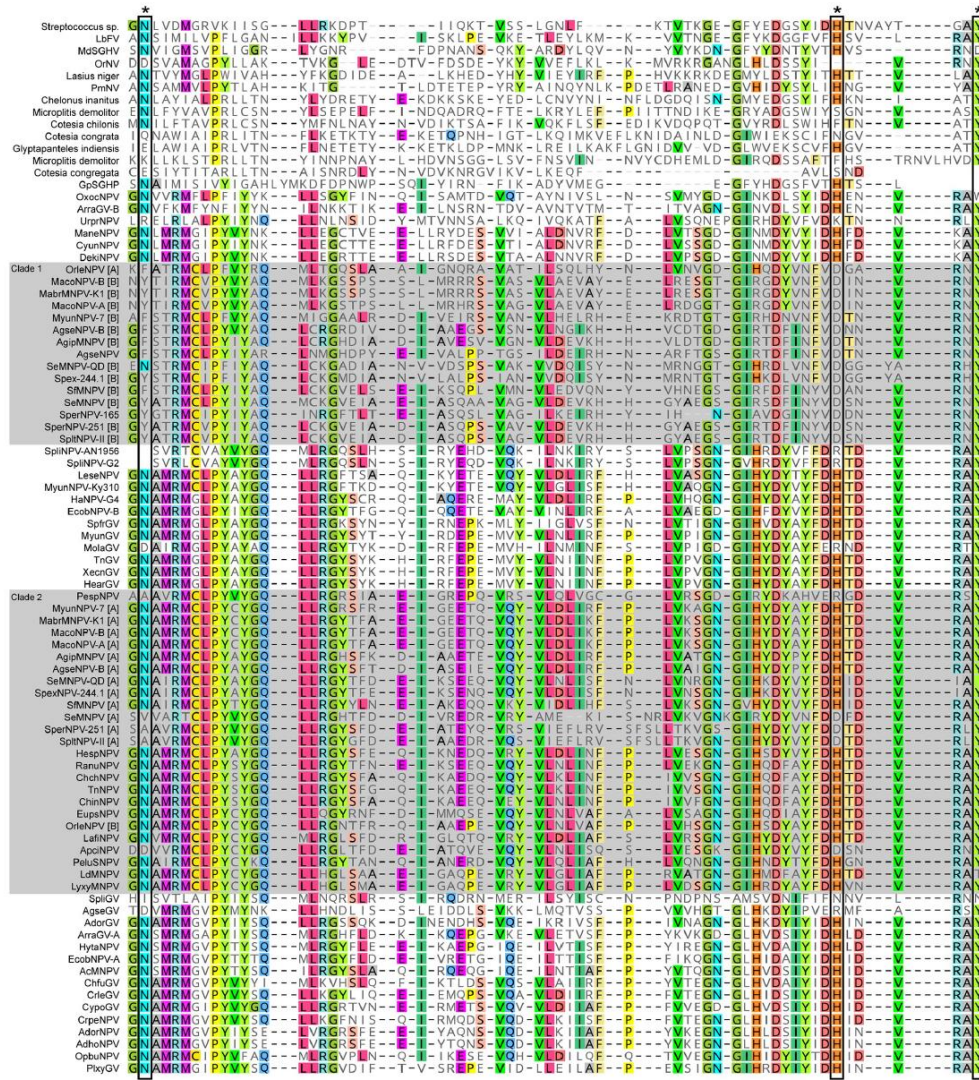


Fig. 4. MAFFT alignment of the predicted amino acid sequence of *odv-e66* focusing on its active site of several baculovirus and other organisms, including bacterium, polydnavirus, nudivirus, and hirtovirus. The active site is composed by three conserved residues N, H, and Y based on bacterium characterization, which are highlighted by asterisk and black box. Clade 1 and Clade 2 belongs to a baculovirus clade that likely underwent an independent duplication during genome evolution. Clade 1 presented substitutions of N to Y/F and H to D.

black box highlights the the conserved residues, N, H, and Y). Interestingly, when the gene is duplicated in the baculovirus genome, the second copy lose its active site in two residues, N to Y/F and H to D (Clade 1). This finding reinforces that the predicted protein sequence of *odv-e66* is likely an active enzyme in most of the analyzed baculoviruses [42].

We carried out a phylogenetic inference using sequences from

baculovirus, other large dsDNA insect viruses, and bacteria (Fig. 5). Large dsDNA viruses formed a monophyletic clade, which could likely depict one putative entrance from bacteria to this viral group (Fig. 5). It is not clear which events took place in the dipteran and hymenopteran baculovirus genomes as both groups lack *odv-e66* homologs in their genomes; therefore, we focused solely on the evolutionary history of lepidopteran baculoviruses. Alphabaculovirus and betabaculovirus

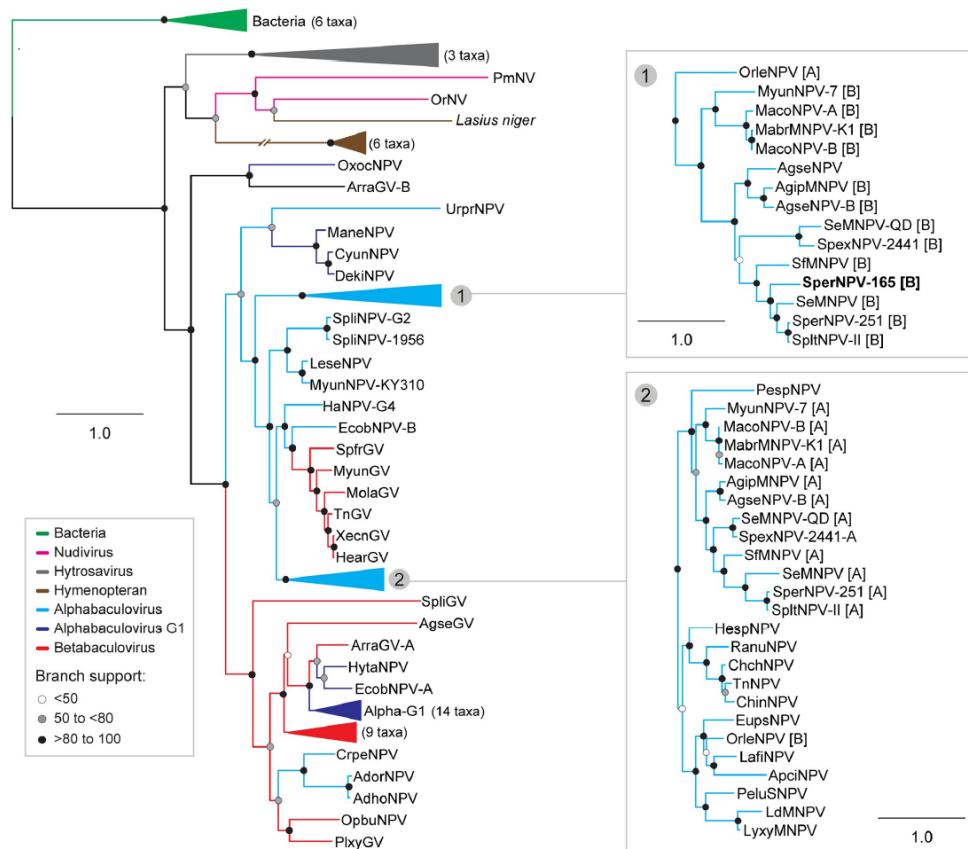


Fig. 5. Phylogenetic inference of *odv-e66*. Phylogenetic inference with the sequences of nudivirus (pink), alphabaculovirus (light blue), and betabaculovirus (red), large dsDNA viruses form a monophyletic clade, as well as branches of baculovirus, representing an entry of the bacteria to this group. Some branches were collapsed for clarity: Bacteria (green), hytrosavirus (grey), hymenopteran (brown), alphabaculovirus group 1 (dark blue), betabaculovirus (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

branches formed a well-supported monophyletic clade (Fig. 5). However, the presence of mixed taxa along the tree branches reinforces several events of gains and losses in the evolution of *odv-e66* inside baculovirus.

The most parsimonious history of *odv-e66* in lepidopteran baculoviruses portrait 30 steps based on gene phylogeny (Fig. 5), gene *loci* within the genomes (Fig. 6A), and gene distribution among baculoviruses (Table 3 and Fig. 6B): 13 deletions, 16 acquisitions, and one duplication were found. We numbered the steps in Fig. 6B from 1 to 30 and summarized it in Table 3. We found one transfer (which could be plesiomorphic or autapomorphic) in the ancestor of alpha and betabaculoviruses (Fig. 6B, step 1, black square). Only homologs of ArraGV and OxocNPV were placed outside of the baculovirus clade, which could indicate independent acquisitions during evolution or a high genetic divergence. The gene locus reinforces the first hypothesis of being acquired independently (Fig. 6B). The *odv-e66* phylogeny reconstructed partially the evolution of baculovirus, which portrays an intensive gene flow and events of HGT among members of

*Baculoviridae*. The duplication of *odv-e66* took place in a single clade of noctuid-infecting baculoviruses. Interestingly, the independent losses in this clades took place in the lineages of SperNPV-CNPSO-165, AgseNPV-A, and PespNPV (Fig. 6B, steps 28 and 29). Both lineages lost the ancestral gene and retained the duplication (as confirmed by the genomic context, Fig. 6A). PespNPV lost the duplicated copy of *odv-e66* and retained the ancestral gene (Fig. 6B, step 28). A very interesting event took place in the m.r.c.a. of the noctuid-isolated granulovirus with big genomes [47], including MyunGV, SpfrGV-008, MolaGV, TnGV, HaGV, and XecnGV (Fig. 6B, steps 3 and 4). The gene *loci* reinforce the m.r.c.a. acquisition (data not shown). The m.r.c.a. lost the ancestral *odv-e66* gene (Fig. 6B, black square) and reacquired it from alphabaculovirus (Fig. 6B, green square). This is reinforced by the gene phylogeny (Fig. 5). ArraGV was the unique lineage of betabaculoviruses with two *odv-e66* copies. From the gene phylogeny, the ArraGV copies seemed to be acquired independently, one from an unknown source and the other one from Alphabaculovirus group I. The genomic context of the gene reinforces the hypothesis of independent acquisition (data not shown).

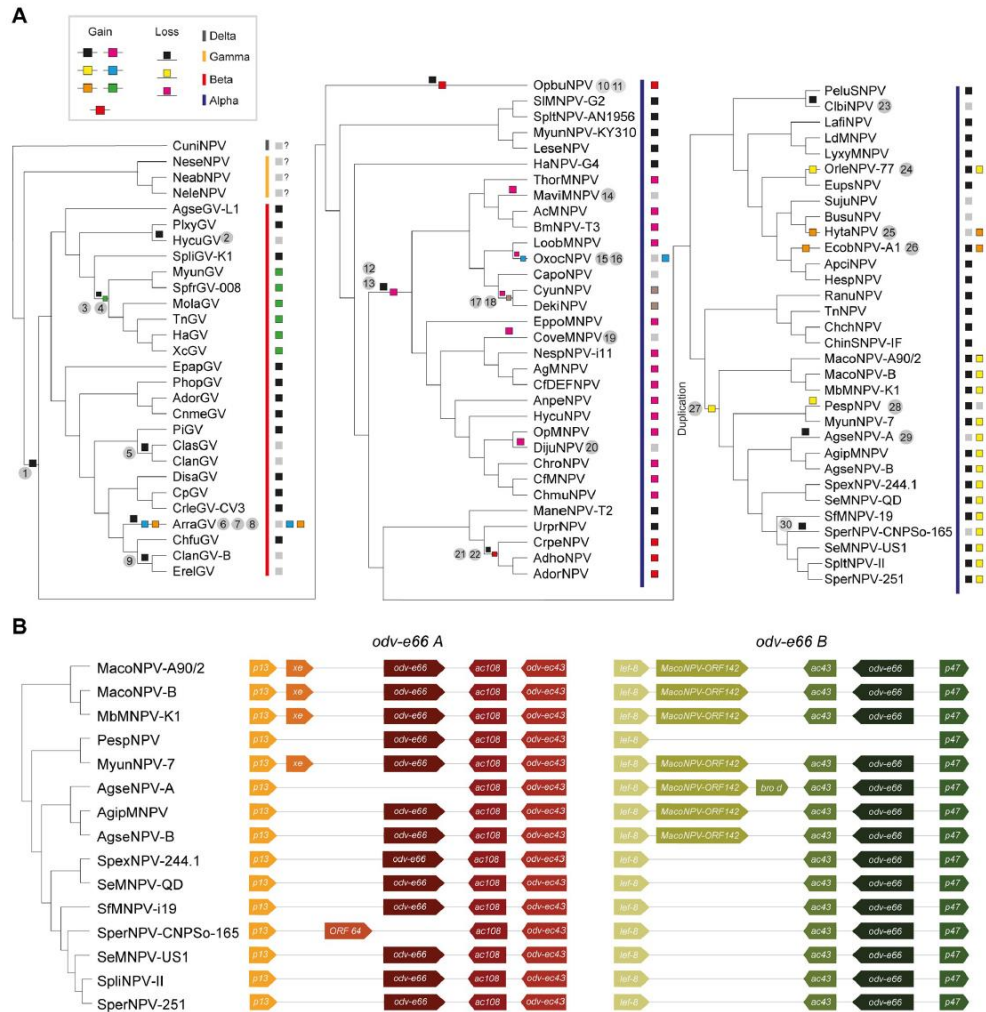


Fig. 6. Genomic context of *odv-e66* and evolutionary analyses of *odv-e66*, a bacterial-related chondroitinase gene homolog. (A) Evolutionary steps with gain, loss, and duplication events for *odv-e66* inside the family *Baculoviridae*. Based on the hypothetical phylogeny trees and genomic context, the history of *odv-e66* and presence in members of lepidopteran-infecting baculovirus are presented. Table 3 summarizes the evolutionary hypothetical events. Gain is depicted by the square on the line and loss the square above the line. (B) Genomic context of the two copies of *odv-e66* (*odv-e66 A* and *odv-e66 B*) according to evolutionary gene analysis and duplication event in closely related species of *SperNPV-CNPSo-165*. The arrowheads represent the direction of the genes in the genome. Arrows with similar colors describe gene orthology.

The inability of *SperNPV-CNPSo-165* to infect orally *S. frugiperda* could be in part explained by the fact that the *SperNPV-CNPSo-165* genome lost one of the copies of *odv-e66*, a gene whose protein product is believed to be implicated in virus host specificity. Moreover, the virus protein is related to a clade in which the two out of three residues in the active site are changed, N to Y and H to D. Therefore, the retained copy of *SperNPV-CNPSo-165* is not clear and must be investigated in further studies.

#### 4. Conclusion

In this work, we characterized a novel baculovirus isolated from the Southern armyworm *S. eridania*, *Spodoptera eridania* nucleopolyhedrovirus CNPSo-165 (*SperNPV-CNPSo-165*). The virus was found to be more lethal to larvae of *S. albula* than *S. eridania* and not able to kill *S. frugiperda*, all three important agricultural Brazilian pests inside the *Spodoptera*-complex. The isolate seemed to be a member of a new

**Table 3**  
Description for *odv-e66* events that likely took place in lepidopteran-isolated baculovirus genomes presented in Fig. 6.

Step	Lineage/hypothetical m.r.c.a. <sup>a</sup>	Event in <i>odv-e66</i> gene evolution	Square colour
1	m.r.c.a. of alpha and betabaculovirus	Acquisition from an undisclosed source	Black
2	HycuGV	Independent loss	Black
3	m.r.c.a. of MyunGV, SpfrGV-008, MolaGV, TnGV, HaGV, and XecnGV	Loss of the ancestral gene	Black
4	XecnGV	Acquisition of an alphabaculovirus-related gene	Green
5	m.r.c.a. of ClasGV and ClanGV	Independent loss	Black
6	ArraGV	Independent loss	Black
7		Independent gain from alphabaculovirus	Blue
8		Independent gain from undisclosed source	Orange
9	m.r.c.a. of ClanGV-B and ErelGV	Independent loss	Black
10	OpbuNPV	Independent loss	Black
11		Independent gain from betabaculovirus	Red
12	m.r.c.a. of group 1 alphabaculovirus	Loss of the ancestral gene	Black
13		Acquisition of a betabaculovirus-related gene	Pink
14	MaviMNPV	Independent loss	Pink
15	OxoNPV	Independent loss	Pink
16		Independent gain from undisclosed source (besides being related to one of the copies from ArraGV)	Blue
17	m.r.c.a. of CyunNPV and DekiNPV	Loss of the ancestral gene acquired by group 1 alphabaculovirus	Pink
18		Reacquisition of an alphabaculovirus-related <i>odv-e66</i>	Beige
19	CoveMNPV	Independent loss	Pink
20	DijuNPV	Independent loss	Pink
21	m.r.c.a. of CrpeNPV, AdorNPV, and AdhoNPV	Loss of the ancestral gene	Black
22		Acquisition of a betabaculovirus-related gene	Red
23	CibiNPV	Independent loss	Black
24	OrleNPV-77	Independent gain from the alphabaculovirus duplication gene	Yellow
25	HytaNPV	Independent gain from a betabaculovirus source	Orange
26	EcobNPV-A1	Independent gain from a betabaculovirus source	Orange
27	m.r.c.a. of several noctuid-infecting alphabaculoviruses	Independent duplication	Yellow
28	PespNPV	Independent loss of the duplicated gene version	Yellow
29	AgseNPV-A	Independent loss of the ancestral gene version	Black
30	SperNPV-CNPSO-165	Independent loss of the ancestral gene version	Black

<sup>a</sup> Hypothetical most recent common ancestor.

tentative species inside *Alphabaculovirus*, closely related to the m.r.c.a. of SeMNPV-US1, SpltNPV-II, and SperNPV-251 viruses with a genome of 137,373 bp in size, G + C content of 42.8% and 151 annotated ORFs. SperNPV-CNPSO-165 genome harbored only one copy of *odv-e66*, whereas its closely related viruses present two copies. The evolution of *odv-e66* in baculovirus presented several events, including gene loss, gain, and duplication. Overall, the study of baculovirus allows a better understanding of the virus family evolution, providing important information for the development and improvement of tools for biological control and biotechnology.

#### Funding statements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 428799/2018-3 and 305468/2019-7), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES/PROEX, grant number 23038.004173/2019-93) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, grant number 193.001532/2016).

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jygeno.2020.06.047>.

#### References

- J.L. Capinera, Southern Armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae), University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS, 1999 Available at: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN26300.pdf> (Accessed on: March 5, 2019).
- C.F.S. Hoo, G. Fraenkel, The selection of food plants in a polyphagous insect, *Prodenia eridania* (Cramer), *J. Insect Physiol.* 12 (6) (1966) 693–709, [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(66\)90115-6](https://doi.org/10.1016/0022-1910(66)90115-6).
- A.C. Formentini, D.R. Sosa-Gómez, S.V. de Paula-Moraes, N.M. de Barros, A. Specht, Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay, *Ciênc. Rural.* 45 (12) (2015) 2113–2120, <https://doi.org/10.1590/0103-8478r20141258>.
- K.B. Santos, A.M. Meneguim, W.J. Santos, P.M. Neves, R.B. Santos, Caracterização dos danos de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmíodes* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a estruturas de algodoeiro, *Neotrop. Entomol.* 39 (4) (2010) 626–631, <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000400025>.
- L.C. Bortoli, A. Bertin, C.F.S. Efrom, M. Botton, Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em morangueiro e videira, *Rev. Bras. Frutic.* 34 (4) (2012) 1068–1073, <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000400013>.
- K.B.D. Santos, A.M. Meneguim, P.M. Neves, Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros, *Neotrop. Entomol.* 34 (6) (2005) 903–910, <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600005>.
- B.H.S. Souza, A.L. Boiça, J.C. Janini, A.G. Silva, N.E.L. Rodrigues, Feeding of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean genotypes/Alimentación de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) en genotipos de soja, *Rev. Colomb. Entomol.* 38 (2) (2012) 215 [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882012000200009&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882012000200009&lng=en) (Accessed on: March 18, 2019).
- D.F.M. Fragoso, J.R. Carvalho, A.P. Barros, T. Coffer, J.J.P. Marchiori, Lagarta-das-folhas (*Spodoptera eridania*), in: Holtz, Anderson Mathias (Eds.), *Pragas Básicas*, 9 Ifes, Colatina, 2015, pp. 192–209. Available at: [researchgate.net/publication/306097692\\_LAGARTA-DAS-FOLHAS\\_Spodoptera\\_eridania](https://researchgate.net/publication/306097692_LAGARTA-DAS-FOLHAS_Spodoptera_eridania) (Accessed on: July 9, 2019).
- P.J. Gullan, P.S. Cranston, *The Insects: An Outline of Entomology*, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester West Sussex, 2014, <https://doi.org/10.1007/s10841-010-9351-x>.
- D.R. Sosa-Gomez, F.S. Morgado, R.F.T. Correa, L.A. Silva, D.M.P. Ardisson-Araújo, B.M.P. Rodrigues, E.E. Oliveira, R.W.S. Aguiar, B.M. Ribeiro, Entomopathogenic viruses in the neotropics: current status and recently discovered species, *Neotrop. Entomol.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00770-1>.
- B. Szewczyk, L. Hoyos-Carvajal, M. Paluszek, I. Skrzeczek, M.L. De Souza, Baculoviruses—re-emerging biopesticides, *Biotechnol. Adv.* 24 (2) (2006) 143–160, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.001>.
- D.R. Sosa-Gómez, Microbial control of soybean pest insects and mites, *Microbial Control of Insect and Mite Pests*, Academic Press, 2017, pp. 199–208, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00013-5>.
- D.R. Sosa-Gómez, F. Moscardi, B. Santos, L.F.A. Alves, S.B. Alves, Produção e uso de

- virus para o controle de pragas na América Latina. Controle Microbiano de Pragas na América Latina, 3 FEALQ, Piracicaba, Brazil, 2008, pp. 69–110. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/291300500\\_Fungos\\_entomopatogenicos\\_usados\\_no\\_controle\\_de\\_pragas\\_na\\_America\\_Latina](https://www.researchgate.net/publication/291300500_Fungos_entomopatogenicos_usados_no_controle_de_pragas_na_America_Latina) (Accessed on: January 2, 2019).
- [14] G.F. Rohrmann, Baculovirus Molecular Biology, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2013 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/> (Accessed on: February 15, 2019).
- [15] J.A. Jehle, G.W. Blissard, B.C. Bonning, J.S. Cory, E.A. Herniou, G.F. Rohrmann, D.A. Thielmann, S.M. Thiem, J.M. Vlak, On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision, *Arch. Virol.* 151 (7) (2006) 1257–1266, <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>.
- [16] L.B. Trentin, E.R. Santos, A.G.O. Junior, D.R. Sosa-Gómez, B.M. Ribeiro, D.M. Ardisson-Araújo, The complete genome of *Rachiplusia* nu nucleopolyhedrovirus (RanuNPV) and the identification of a baculoviral CPD-photolyase homolog, *Virology* 534 (2019) 64–71, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.05.019>.
- [17] J. Slack, B.M. Arif, The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function, *Adv. Virus Res.* 69 (2006) 99–165, [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)69003-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)69003-9).
- [18] B.A. Federici, Baculovirus pathogenesis, *The Baculoviruses*, Springer, Boston, MA, 1997, pp. 33–59, [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1834-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1834-5_3).
- [19] R.L. Harrison, D.L. Rowley, Complete genome sequence of an Alphabaculovirus from the southern armyworm, *Spodoptera eridania*, *Microbiol. Resour. Anounc.* 8 (3) (2019) e01277-18, <https://doi.org/10.1128/MRA.01277-18>.
- [20] D.R. O'Reilly, L.K. Miller, V.A. Luckow, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford University Press on Demand, 1994, [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=IP8VFRX8zHMC&oi=fnd&pg=PA11&ots=Cexne.OzIT&sig=zszDzuaXuRPGc\\_SkUy931QT5E0&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=IP8VFRX8zHMC&oi=fnd&pg=PA11&ots=Cexne.OzIT&sig=zszDzuaXuRPGc_SkUy931QT5E0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (Accessed on: May 8, 2019).
- [21] E.R. Santos, L.B. Oliveira, L. Peterson, D.R. Sosa-Gómez, B.M. Ribeiro, D.M.P. Ardisson-Araújo, The complete genome sequence of the first hesperiid-infecting alphabaculovirus isolated from the leguminous pest *Urbanus proteus* (Lepidoptera: Hesperidae), *Virus Res.* 249 (2018) 76–84, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.03.009>.
- [22] D.M.P. Ardisson-Araújo, F.L. Melo, M.S. Andrade, R.M.C. Brancalhão, S.N. Bão, B.M. Ribeiro, Complete genome sequence of the first non-Asian isolate of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, *Virus Genes.* 49 (3) (2014) 477–484, <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1112-6>.
- [23] M. Kearse, R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data, *Bioinformatics* 28 (12) (2012) 1647–1649, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- [24] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (17) (1997) 3389–3402.
- [25] K. Katoh, K. Misawa, K. Kuma, T. Miyata, MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acids Res.* 30 (14) (2002) 3059–3066, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt436>.
- [26] A. Stamatakis, P. Hoover, Jacques Rougemont, A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers, *Syst. Biol.* 57 (5) (2008) 758–771, <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>.
- [27] M. Anisimova, M. Gil, J.F. Dufayard, C. Dessimoz, O. Gascuel, Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes, *Syst. Biol.* 60 (5) (2011) 685–699, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr041>.
- [28] J.T. Wennmann, J. Keilwagen, J.A. Jehle, Baculovirus Kimura two-parameter species demarcation criterion is confirmed by the distances of 38 core gene nucleotide sequences, *J. Gen. Virol.* 99 (9) (2018) 1307–1320, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001100>.
- [29] J. Schultz, F. Milpetz, P. Bork, C.P. Ponting, SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (11) (1998) 5857–5864, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5857>.
- [30] J. Söding, A. Biegert, A.N. Lupas, The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction, *Nucleic Acids Res.* 33 (2) (2005) W244–W248, <https://doi.org/10.1093/nar/gki408>.
- [31] S. Guindon, J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, *Syst. Biol.* 59 (3) (2010) 307–321, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- [32] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (7) (2016) 1870–1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [33] A.A. Lima, C.W.S. Aragao, M.E.B. Castro, J.V.C. Oliveira, D.R. Sosa-Gómez, B.M. Ribeiro, A recombinant *Anticarsia gemmatilis* MNPV harboring *chiA* and *v-cath* genes from *Choristoneura fumiferana* defective NPV induce host liquefaction and increased insecticidal activity, *PLoS One* 8 (9) (2013) e74592, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074592>.
- [34] G.L. Greene, N.C. Leppa, W.A. Dickerson, Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium, *J. Econ. Entomol.* 69 (4) (1976) 487–488, <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>.
- [35] T. Martins, R. Montiel, J. Medeiros, L. Oliveira, N. Simões, Occurrence and characterization of a nucleopolyhedrovirus from *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) isolated in the Azores, *J. Invertebr. Pathol.* 89 (3) (2005) 185–192, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.06.012>.
- [36] M. Ordóñez-García, C. Ríos-Velasco, J.J. Ornelas-Paz, J.C. Bustillos-Rodríguez, C.H. Acosta-Muñiz, D.I. Berlanga-Reyes, M.A. Salas-Marina, O.J. Cambero-Campos, G. Gallegos-Morales, Molecular and morphological characterization of multiple nucleopolyhedrovirus from Mexico and their insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *J. Appl. Entomol.* 144 (1–2) (2020) 123–132, <https://doi.org/10.1111/jen.12715>.
- [37] S.R. Escasa, R.L. Harrison, J.D. Mowery, G.R. Bauchan, J.S. Cory, The complete genome sequence of an alphabaculovirus from *Spodoptera* exempta, an agricultural pest of major economic significance in Africa, *PLoS One* 14 (2) (2019), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209937>.
- [38] T.Z. Salem, X.H. Cheng, X.W. Cheng, AcMNPV enhances infection by ThorNPV in S21 cells and SeMNPV in H5 cells, *Arch. Virol.* 157 (10) (2012) 1875–1885, <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1347-2>.
- [39] L. Wang, T.Z. Salem, D.E. Lynn, X.W. Cheng, Slow cell infection, inefficient primary infection and inability to replicate in the fat body determine the host range of *Thysanoplusia orichalcea* nucleopolyhedrovirus, *J. Gen. Virol.* 89 (6) (2008) 1402–1410, <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000695-0>.
- [40] B. Le Ru, J. Barbut, C. Capdevielle-Dulac, M. Gofitshu, G.J. Kergoat, Re-establishment of *Spodoptera teferii* Laporte in Rougeot (Lepidoptera: Noctuidae, Noctuidae), with an updated molecular phylogeny for the genus *Spodoptera* Guenée, *Ann. Soc. Entomol. France (N.S.)* 54 (6) (2018) 497–510, <https://doi.org/10.1080/00379271.2018.1528886>.
- [41] M.J. Garavaglia, S.A.B. Miele, J.A. Iserre, M.N. Belach, P.D. Ghiringhelli, The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae, *J. Virol.* 86 (22) (2012) 12069–12079, <https://doi.org/10.1128/JVI.01873-12>.
- [42] Y. Kawaguchi, N. Sugiura, K. Kimata, M. Kimura, Y. Kakuta, The crystal structure of novel chondroitin lyase ODV-E66, a baculovirus envelope protein, *FEBS Lett.* 587 (24) (2013) 3943–3948, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.021>.
- [43] D. Hou, W. Kuang, S. Luo, et al., Baculovirus ODV-E66 degrades larval peritrophic membrane to facilitate baculovirus oral infection, *Virology* 537 (2019) 157–164, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.027>.
- [44] J.R. Baker, S. Dong, D.G. Pritchard, The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A, *Biochem. J.* 365 (1) (2002) 317–322, <https://doi.org/10.1042/bj20020149>.
- [45] W.L. Hynes, L. Hancock, J.J. Ferretti, Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity, *Infect. Immun.* 63 (8) (1995) 3015–3020, <https://doi.org/10.1128/IAI.63.8.3015-3020.1995>.
- [46] J. Féthière, B. Eggmann, M. Cygler, Crystal structure of chondroitin AC lyase, a representative of a family of glycosaminoglycan degrading enzymes, *J. Mol. Biol.* 288 (4) (1999) 635–647, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2698>.
- [47] D.M.P. Ardisson-Araújo, A. M. R. Silva, F.L. Melo, E.R. Santos, D. R. Sosa-Gómez, B. M. Ribeiro, A novel betabaculovirus isolated from the monocopet pest mocsis latipes (Lepidoptera: Noctuidae) and the evolution of multiple-copy genes, *Viruses* 10(3).



## 5 CONCLUSÃO

A presente dissertação dedicou-se à caracterização em nível estrutural, biológico e molecular de um novo baculovírus isolado de lagartas-da-vagem da espécie *S. eridania*, denominado *Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus* isolado CNPSo-165 (SperNPV-CNPSo-165). O vírus possui OBs poliédricos com vírions oclusos contendo múltiplos nucleocapsídeos por envelope. Verificou-se que o vírus é mais letal para as larvas de *S. albula* que de *S. eridania* e não é capaz de matar larvas da espécie *S. frugiperda*, três importantes pragas agrícolas brasileiras dentro do complexo *Spodoptera*. O isolado é membro de uma nova espécie tentativa inserido no ramo dos *Alphabaculovirus*, proximamente relacionada ao m.r.c.a. dos vírus SeMNPV-US1, SpltNPV-II e SperNPV-251 com um genoma de 137.373 pb de tamanho, conteúdo de G + C de 42,8%, 151 ORFs anotadas e 16 ORFs únicas. Pelo critério de demarcação das espécies de baculovirus (*i.e.* aplicando-se o modelo ajustado de Kimura-2-parâmetros em regiões específicas de genes estudados), descobriu-se que um isolado de *S. eridania* denominado SperNPV-251 é relacionado ao isolado *Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus* II, obtido de *S. litura*, diferente do que foi observado para SperNPV-CNPSo-165, no presente trabalho. Entretanto, SperNPV-251 foi utilizado como membro tipo para estabelecimento da espécie *Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus*. Possivelmente, o isolado SperNPV-CNPSo-165 será o representante de uma nova espécie tentativa *Spodoptera eridania nucleopolyhedrovirus B*. O vírus aqui caracterizado apresenta uma única cópia de um homólogo da *odv-e66*, uma controitina-liase de origem bacteriana, que em isolados proximamente relacionados está presente na forma duplicada. Entretanto, o genoma de SperNPV-CNPSo-165 parece ter perdido de forma independente este gene, apresentando apenas uma única cópia. Um gene cujos homólogos apresentam uma intrincada histórica evolutiva de ganho, perda, reganho e duplicação, característico de genomas plásticos como o dos baculovírus. A descoberta, caracterização e descrição de novos baculovírus permite entender a sua evolução em uma perspectiva mais ampla, como a observada neste trabalho bem como podem levar ao desenvolvimento de pesticidas mais efetivos e seguros, controlando populações de insetos que causam diversos danos às culturas o que, sem dúvidas possibilita melhores condições para o meio ambiente e para a sociedade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANISIMOVA, Maria et al. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. **Systematic biology**, v. 60, n. 5, p. 685-699, 2011.

ARDISSON-ARAÚJO, Daniel Mender Pereira. Genômica, evolução e caracterização funcional de genes de baculovírus. 2015.

ARDISSON-ARAÚJO, Daniel Mendes Pereira et al. Complete genome sequence of the first non-Asian isolate of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus. **Virus genes**, v. 49, n. 3, p. 477-484, 2014.

BORTOLI, LÍGIA CAROLINE et al. Biologia e tabela de vida de fertilidade de Spodoptera eridania (Cramer)(Lepidoptera: Noctuidae) em morangueiro e videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1068-1073, 2012.

BRAUNAGEL, S. C. et al. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of Autographa californica nucleopolyhedrovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 9797-9802, 2003.

BRAUNAGEL, Sharon C.; SUMMERS, Max D. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. **Current drug targets**, v. 8, n. 10, p. 1084-1095, 2007.

CAPINERA, John L. **Southern armyworm, Spodoptera eridania (Cramer)(Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS, 1999.

CARVALHO, Renato A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm Spodoptera frugiperda. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62268, 2013.

CASTRO, Maria Elita Batista et al. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.

CLEM, Rollie J.; PASSARELLI, A. Lorena. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 11, p. e1003729, 2013.

COSTA, Lucio G. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. In: **Handbook of clinical neurology**. Elsevier, 2015. p. 135-148.

DA SILVA, Débora Mello. Aspectos biológicos e nutricionais do complexo Spodoptera ssp.

em culturas anuais. **Embrapa Soja-Tese/dissertação (ALICE)**, 2014.

DE BLEECKER, Jan L. Organophosphate and carbamate poisoning. **Handbook of clinical neurology**, v. 91, p. 401-432, 2008.

DE SOUZA, Bruno Henrique Sardinha et al. Feeding of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean genotypes. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 38, n. 2, p. 215-223, 2012.

DJIKENG, Appolinaire; SPIRO, David. Advancing full length genome sequencing for human RNA viral pathogens. 2009.

FAVETTI, Bruna Magda; BUTNARIU, Alessandra Regina; FOERSTER, Luís Amilton. Biology and reproductive capacity of *Spodoptera eridania* (Cramer)(Lepidoptera, Noctuidae) in different soybean cultivars. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, n. 2, p. 89-95, 2015.

FEDERICI, Brian A. Baculovirus pathogenesis. In: **The baculoviruses**. Springer, Boston, MA, 1997. p. 33-59.

FORMENTINI, Aline Carraro et al. Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay. **Ciência Rural**, v. 45, n. 12, p. 2113-2120, 2015.

FRAGOSO, D. F. M. et al. LAGARTA-DAS-FOLHAS (*Spodoptera eridania*). In: **HOLTZ, Anderson Mathias et al. Pragas Básicas**. Colatina: Ifes, 2015. Cap. 9. p. 192-209

GALLO, D. et al. RS; OMOTO, C. **Entomologia agrícola. Piracicaba: Fealq**, 2002.

GANDHI, Neha S.; MANCERA, Ricardo L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chemical biology & drug design**, v. 72, n. 6, p. 455-482, 2008.

GARAVAGLIA, Matías Javier et al. The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae. **Journal of virology**, v. 86, n. 22, p. 12069-12079, 2012.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GUINDON, Stéphane et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The Insects: An outline of entomology, John Wiley and Sons. **Ltd., Chichester, West Sussex**, 2014.

HAASE, Santiago; SCIOCCO-CAP, Alicia; ROMANOWSKI, Víctor. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2230-2267, 2015.

HARRISON, Robert L.; ROWLEY, Daniel L. Complete Genome Sequence of an Alphabaculovirus from the Southern Armyworm, *Spodoptera eridania*. **Microbiol Resour Announc**, v. 8, n. 3, p. e01277-18, 2019.

HASSAAN, Mohamed A.; EL NEMR, Ahmed. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, 2020.

HERNIOU, Elisabeth A. et al. The genome sequence and evolution of baculoviruses. **Annual review of entomology**, v. 48, n. 1, p. 211-234, 2003.

HOULDCROFT, Charlotte J.; BEALE, Mathew A.; BREUER, Judith. Clinical and biological insights from viral genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 183-192, 2017.

ICTV. International committee on taxonomy of viruses. Release. 2019

JAVED, Muhammad Afzal et al. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus AC83 is a per os infectivity factor (PIF) protein required for occlusion-derived virus (ODV) and budded virus nucleocapsid assembly as well as assembly of the PIF complex in ODV envelopes. **Journal of virology**, v. 91, n. 5, 2017.

JEHLE, J. A., et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7. 2006.

KATOH, Kazutaka et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059-3066, 2002.

KAWAGUCHI, Yoshirou et al. The crystal structure of novel chondroitin lyase ODV-E66, a baculovirus envelope protein. **FEBS letters**, v. 587, n. 24, p. 3943-3948, 2013.

KEARSE, Matthew et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LIMA, Anabele Azevedo et al. A recombinant *Anticarsia gemmatalis* MNPV harboring *chiA* and *v-cath* genes from *Choristoneura fumiferana* defective NPV induce host liquefaction and increased insecticidal activity. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74592, 2013.

LINHARDT, Robert J. et al. CS lyases: structure, activity, and applications in analysis and the treatment of diseases. **Advances in pharmacology**, v. 53, p. 187-215, 2006.

LOMBARD, Vincent et al. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for

glycogenomics. **Biochemical Journal**, v. 432, n. 3, p. 437-444, 2010.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020.

LUCAROTTI, Christopher J. et al. Pathology of a Gammabaculovirus in its natural balsam fir sawfly (*Neodiprion abietis*) host. **Psyche**, v. 2012, 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. **AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 13 de maio de 2019.

MARTYNIUK, Christopher J.; MEHINTO, Alvine C.; DENSLOW, Nancy D. Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 110764, 2020.

MENA, Jimmy A.; KAMEN, Amine A. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. **Expert review of vaccines**, v. 10, n. 7, p. 1063-1081, 2011.

MIELE, Solange Ana Belen et al. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. **International journal of evolutionary biology**, v. 2011, 2011.

MOREIRA, HJ da C.; ARAGÃO, F. D. Manual de pragas da soja. **Campinas: FMC**, 2009.

MOSCARDI, Flavio. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual review of entomology**, v. 44, n. 1, p. 257-289, 1999.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

OHKAWA, Taro; VOLKMAN, Loy E.; WELCH, Matthew D. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. **The Journal of cell biology**, v. 190, n. 2, p. 187-195, 2010.

O'REILLY, David R.; MILLER, Lois K.; LUCKOW, Verne A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. Oxford University Press on Demand, 1994.

PENG, Ke et al. Characterization of novel components of the baculovirus per os infectivity factor complex. **Journal of virology**, v. 86, n. 9, p. 4981-4988, 2012.

PETIT, Emmanuel et al. Chondroitin sulfate lyases: applications in analysis and glycobiology. **Advances in Pharmacology**, v. 53, p. 167-186, 2006.

POGUE, Michael G. **A world revision of the genus Spodoptera Guenée:(Lepidoptera: Noctuidae)**. Philadelphia: American Entomological Society, 2002.

QUINTELA, E. D. et al. Desafios do manejo integrado de pragas da soja no Brasil Central.

Embrapa Arroz e Feijão-Comunicado Técnico (**INFOTECA-E**), 2007.

REDMAN, Elizabeth M. et al. High levels of genetic diversity in *Spodoptera exempta* NPV from Tanzania. **Journal of invertebrate pathology**, v. 105, n. 2, p. 190-193, 2010.

RIBEIRO, Bergmann Morais et al. BACULOVÍRUS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE INSETOS. **Biotecnologia aplicada à saúde-vol. 2: fundamentos e aplicações**, v. 2, p. 255, 2015.

RICHARDSON, Jason R. et al. Neurotoxicity of pesticides. **Acta neuropathologica**, p. 1-20, 2019.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus molecular biology**. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2019. Disponível em: <<https://ir.library.oregonstate.edu/concern/defaults/7d279043k>> Acesso em: 21 de junho, 2020.

ROVESTI, L. Lotta biologica contro i fitofagi-Teoria e pratica. 1992.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W., 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, New York.

SANTOS, K.B. Caracterização dos danos de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a estruturas de algodoeiro. **Neotropical Entomology**, v.39, n.4, p.626-631, 2010.

SANTOS, Karen B. dos; MENEGUIM, Ana M.; NEVES, Pedro MOJ. Biology and consumption of *Spodoptera eridania* (Cramer)(Lepidoptera: Noctuidae) in different hosts. **Neotropical entomology**, v. 34, n. 6, p. 903-910, 2005.

SCHWEDE, Torsten et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3381-3385, 2003.

SHI, Yang et al. Three-dimensional visualization of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virion envelopment process gives new clues as to its mechanism. **Virology**, v. 476, p. 298-303, 2015.

SLACK, J.; ARIF, B. M. The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function. **Advances in virus research**, v. 69, p. 99-165, 2007.

SMITS, P. H.; VLAK, J. M. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 51, n. 2, p. 107-114, 1988.

SÖDING, Johannes; BIEGERT, Andreas; LUPAS, Andrei N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl\_2, p. W244-W248, 2005.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Produção e uso de vírus para o controle de pragas na América Latina. **Controle Microbiano de Pragas na America Latina. FEALQ. Piracicaba, Brazil**,

2008.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Microbial Control of Soybean Pest Insects and Mites. In: **Microbial Control of Insect and Mite Pests**. 2017. p. 199-208.

SOSA-GOMEZ, D. R. et al. Entomopathogenic Viruses in the Neotropics: Current Status and Recently Discovered Species. **Neotropical entomology**, 2020.

STAMATAKIS, Alexandros; HOOVER, Paul; ROUGEMONT, Jacques. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. **Systematic biology**, v. 57, n. 5, p. 758-771, 2008.

SUMMERS, Max D. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. **Advances in virus research**, v. 68, p. 3-73, 2006.

SUN, X.L.; PENG, H.Y., Recent advances in biological control of pest insects by using viruses in China. **Virolog Sin.** 22 (2), 158–162. 2007.

SURATMAN, Suratman; EDWARDS, John William; BABINA, Kateryna. Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: pathways and risk of adverse health effects. **Reviews on environmental health**, v. 30, n. 1, p. 65-79, 2015.

SZEWCZYK, Boguslaw, et al. Baculoviruses: re-emerging biopesticides. **Biotechnol.B Adv.** 24 (2), 143–160. 2006.

THIEM, Suzanne M. Baculovirus genes affecting host function. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 45, n. 3-4, p. 111-126, 2009.

VAN OERS, Monique M.; PIJLMAN, Gorben P.; VLAK, Just M. Thirty years of baculovirus–insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 1, p. 6-23, 2015.

WRIGHT, Mark G. Biological control of invasive insect pests. In: **Integrated Pest Management**. Academic Press, 2014. p. 267-281.

ZEDDAM, Jean-Louis et al. Características biológicas y diagnóstico inmunológico de un virus de poliedrosis nuclear de *Spodoptera eridania* (Stoll) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Peruana de Entomología**, v. 41, p. 158-163, 1999.

**APÊNDICE A – FIGURA SUPLEMENTAR 1**

**Table S1.** Genomes used in this paper for reconstruction of the baculovirus phylogeny in the Fig. 2. The isolates placed into the genera *Alphabaculovirus* (dark blue), *Betabaculovirus* (pink), *Gammabaculovirus* (orange), and *Deltabaculovirus* (light blue) are presented together with the acronym used in the main text, the host family where the virus was isolated from, the G+C content, the Genbank accession number, the genome size, and the global identity in relation to SpermNPV-VPN165 (using a pairwise alignment of the concatenated nucleotide sequence of the 38 baculovirus core genes).

<b>Baculovirus</b>	<b>Acronym</b>	<b>Host family</b>	<b>G + C content (%)</b>	<b>Accession number</b>	<b>Genome Size (bp)</b>	<b>Id (%)</b>
1 Adoxyphyes honmai nucleopolyhedrovirus	AdhoNPV	Tortricidae	35.6	AP006270	113220	52.7
2 Adoxyphyes orana nucleopolyhedrovirus	AdorNPV	Tortricidae	35	EU591746	111724	52.7
3 Agrotis ipsilon multiple nucleopolyhedrovirus strain Illinois	AgipMNPV	Noctuidae	48.6	EU839994	155122	70.0
4 Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus	AgseNPV-A	Noctuidae	45.7	DQ123841	147544	69.4
5 Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus B	AgseNPV-B	Noctuidae	45.7	KM102981	148980	69.3
6 Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus isolate L2	AnpeNPV-L2	Saturniidae	53.5	EF207986	126246	48.3
7 Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus	AgMNPV	Noctuidae	44.5	DQ813662	132239	48.5
8 Apocheima cinerarium nucleopolyhedrovirus	ApciNPV	Geometridae	33.4	FJ914221	123876	49
9 Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus clone C6	AcMNPV-C6	Noctuidae	40.7	L22858	133894	50.1
10 Bombyx mori nucleopolyhedrovirus strain T3	BmNPV-T3	Bombycidae	40.4	L33180	128413	50
11 Buzura suppressaria nucleopolyhedrovirus	BusuNPV	Geometridae	36.8	KF611977	120420	54.1
12 Catopsilia pomona nucleopolyhedrovirus	CapoNPV	Pieridae	39.7	KU565883	128058	49.3
13 Choristoneura fumiferana defective multiple nucleopolyhedrovirus	CfDEFMNPV	Tortricidae	45.8	AY327402	131160	48.6
14 Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus	CfMNPV	Tortricidae	50.1	AF512031	129593	48.3



---

15	<i>Choristoneura murinana</i> nucleopolyhedrovirus	ChmuNPV	Tortricidae	50	KF894742	124688	48.4
17	<i>Choristoneura rosaceana</i> nucleopolyhedrovirus	ChroNPV	Tortricidae	48.6	KC961304	129052	48.3
18	<i>Chrysodeixis chalcites</i> nucleopolyhedrovirus	ChchNPV	Noctuidae	39	AY864330	149622	58.6
19	<i>Chrysodeixis includens</i> single nucleopolyhedrovirus isolate IF	ChinSNPV-IF	Noctuidae	39.2	KU669293	139181	58.2
20	<i>Chrysodeixis includens</i> nucleopolyhedrovirus isolate 1	ChinNPV-1	Noctuidae	37.7	MK746083	130540	55.5
21	<i>Clanis bilineata</i> nucleopolyhedrovirus	ClbiNPV	Sphingidae	37.7	DQ504428	135454	53.6
22	<i>Condylorrhiza vestigialis</i> multiple nucleopolyhedrovirus	CoveMNPV	Crambidae	42.9	KJ631623	125767	48.5
23	<i>Cryptophlebia peltastica</i> nucleopolyhedrovirus	CrpeNPV	Tortricidae	37.2	MH394321	115728	54.2
24	<i>Cyclophragma undans</i> nucleopolyhedrovirus	CyunNPV	Lasiocampidae	45.1	KT957089	140418	49.1
25	<i>Dendrolimus kikuchii</i> nucleopolyhedrovirus	DekiNPV	Lasiocampidae	48	JX193905	141454	48.8
26	<i>Dione juno</i> nucleopolyhedrovirus	DijuNPV	Nymphalidae	50.9	MK558262	122075	48.7
27	<i>Ecotropis obliqua</i> nucleopolyhedrovirus strain A1	EcobNPV-A1	Geometridae	37.6	DQ837165	131204	54.1
28	<i>Epiphyas postvittana</i> nucleopolyhedrovirus	EppoNPV	Tortricidae	40.7	AY043265	118584	48.1
29	<i>Euproctis pseudoconsersa</i> nucleopolyhedrovirus	EupsNPV	Lymantriidae	40.3	FJ227128	141291	54.1
30	<i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus G4	HaNPV-G4	Noctuidae	39	AF271059	130759	53.6
31	<i>Hemileuca</i> sp. nucleopolyhedrovirus	HespNPV	Saturniidae	38.1	KF158713	140633	53.1
32	<i>Hyphantria cunea</i> nucleopolyhedrovirus	HycuNPV	Arctiidae	45.5	AP009046	132959	48.4
33	<i>Hyposidra talaca</i> nucleopolyhedrovirus	HytaNPV	Geometridae	39.6	MH261376	139089	54.9
34	<i>Lambdina fiscellaria</i> nucleopolyhedrovirus	LafiNPV	Geometridae	43.7	KP752043	157977	51.4
35	<i>Leucania separata</i> nuclear polyhedrovirus strain AH1	LeseNPV-AH1	Noctuidae	48.6	AY394490	168041	51.5
36	<i>Lonomia obliqua</i> multiple nucleopolyhedrovirus	LoobMNPV	Saturniidae	35.7	KP763670	120022	49.2
37	<i>Lymantria dispar</i> multiple nucleopolyhedrovirus	LdMNPV	Lymantriidae	57.5	AF081810	161046	54

---

38	<i>Lymantria xyлина</i> multiple nucleopolyhedrovirus	LyxyMNPV	Lymantriidae	53.5	GQ202541	156344	54.2
39	<i>Malacosoma neustria</i> nucleopolyhedrovirus isolate T2	ManeNPV-T2	Lasiocampidae	38.2	KY968317	130202	55.3
40	<i>Mamestra brassicae</i> multiple nucleopolyhedrovirus strain K1	MbMNPV-K1	Noctuidae	40.1	JQ798165	152710	63.5
41	<i>Mamestra configurata</i> nucleopolyhedrovirus B	MacoNPV-B	Noctuidae	40	AY126275	158482	63.5
42	<i>Mamestra configurata</i> nucleopolyhedrovirus-A strain 90/2	MacoNPV-A 90/2	Noctuidae	41.7	U59461	155060	63.3
43	<i>Maruca vitrata</i> multiple nucleopolyhedrovirus	MaviMNPV	Crambidae	38.6	EF125867	111953	49.7
44	<i>Mythimna unipuncta</i> nucleopolyhedrovirus strain #7	MyunNPV#7	Noctuidae	48.6	MF375894	148482	64
45	<i>Mythimna unipuncta</i> nucleopolyhedrovirus strain KY310	MyunNPV-KY310	Noctuidae	43.9	MH124167	156647	51.3
46	<i>Neophasia</i> sp. alphabaculovirus isolate 11	NespNPV	Pieridae	44.7	MK293724	129018	48.5
47	<i>Operophtera brumata</i> nucleopolyhedrovirus	OpbuNPV	Geometridae	38.9	MF614691	119054	48.8
48	<i>Orgyia leucostigma</i> nucleopolyhedrovirus isolate CFS-77	OrleNPV	Lymantriidae	39.9	EU309041	156179	54.3
49	<i>Orgyia pseudotsugata</i> multiple nucleopolyhedrovirus	OpMNPV	Lymantriidae	55.1	U75930	131995	48.4
50	<i>Oxyplax ochracea</i> nucleopolyhedrovirus	OxocNPV	Limacodidae	31.2	MF143631	113971	48.3
51	<i>Peridroma</i> sp. nucleopolyhedrovirus	PespNPV	Noctuidae	53.2	KM009991	151109	65.9
52	<i>Perigonia lusca</i> single nucleopolyhedrovirus	PeluSNPV	Sphingidae	39.6	KM596836	132831	54.2
53	<i>Rachiplusia nu</i> nucleopolyhedrovirus	RanuNPV	Noctuidae	37.9	MK419956	128587	55.8
54	<i>Spodoptera exempta</i> nucleopolyhedrovirus strain 244.1	SpexNPV-244.1	Noctuidae	41.2	MH717816	129528	68.8
55	<b><i>Spodoptera eridania</i> nucleopolyhedrovirus CNPSo 165</b>	<b>SperNPV-CNPSo165</b>	<b>Noctuidae</b>	<b>42.8</b>	<b>MT040195</b>	<b>137373</b>	<b>100</b>
56	<i>Spodoptera eridania</i> nucleopolyhedrovirus 251	SperNPV-251	Noctuidae	45	MH320559	149090	75.5
57	<i>Spodoptera exigua</i> multiple nucleopolyhedrovirus	SeMNPV-US1	Noctuidae	43.8	AF169823	135611	77.8
58	<i>Spodoptera exigua</i> multiple nucleopolyhedrovirus isolate QD	SeMNPV-QD	Noctuidae	37.4	MH370144	128525	67.6
59	<i>Spodoptera frugiperda</i> multiple nucleopolyhedrovirus isolate 19	SfMNPV-I19	Noctuidae	40.3	EU258200	132565	73.2

60	<i>Spodoptera littoralis</i> nucleopolyhedrovirus isolate AN1956	SpliNPV-1956	Noctuidae	44.7	JX454574	137998	51.2
61	<i>Spodoptera litura</i> multiple nucleopolyhedrovirus G2	SIMNPV-G2	Noctuidae	42.8	AF325155	139342	51.3
62	<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus II	SliNPV-II	Noctuidae	45	EU780426	148634	78.9
63	<i>Sucra jujuba</i> nucleopolyhedrovirus	SujuNPV	Geometridae	38.7	KJ676450	135952	53.7
64	<i>Thysanoplusia orichalcea</i> nucleopolyhedrovirus	ThorNPV	Noctuidae	39.5	JX467702	132978	49.7
65	<i>Trichoplusia ni</i> single nucleopolyhedrovirus	TnSNPV	Noctuidae	39	DQ017380	134394	58.2
66	<i>Urbanus proteus</i> nucleopolyhedrovirus	UrprNPV	Hesperiidae	34.7	KR011717	105555	52.1
67	<i>Adoxophyes orana</i> granulovirus	AdorGV	Tortricidae	34.5	AF547984	99657	39.4
68	<i>Agrotis segetum</i> granulovirus-L1	AgseGV-L1	Noctuidae	37.3	KC994902	131442	39.3
69	<i>Artogeia rapae</i> granulovirus isolate Wuhan	ArraGV-Wuhan	Pieridae	33.2	GQ884143	108592	40.3
70	<i>Choristoneura fumiferana</i> granulovirus	ChfuGV	Tortricidae	50.1	DQ333351	104710	39.6
71	<i>Clostera anastomosis</i> granulovirus	CaLGV	Notodontidae	46.7	KC179784	101818	39.8
72	<i>Clostera anastomosis</i> granulovirus isolate ClanGV-B	ClanGV-B	Notodontidae	37.8	KR091910	107409	40.2
73	<i>Clostera anachoreta</i> granulovirus	ClanGV	Notodontidae	44.4	HQ116624	101487	39.9
74	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i> granulovirus	CnmeGV	Crambidae	35.2	KP658210	112060	38.8
75	<i>Cryptophlebia leucotreta</i> granulovirus isolate CV3	CrleGV	Tortricidae	32.4	AY229987	110907	39.6
76	<i>Cydia pomonella</i> granulovirus	CpGV	Tortricidae	45.3	U53466	123500	40
77	<i>Diatraea saccharalis</i> granulovirus	DisaGV	Crambidae	34.9	KP296186	98392	40.1
78	<i>Epinotia aporema</i> granulovirus	EpapGV	Tortricidae	41.5	JN408834	119082	40.2
79	<i>Erinnyis ello</i> granulovirus	ErelGV	Sphingidae	38.7	KJ406702	102759	39.8
80	<i>Helicoverpa armigera</i> granulovirus	HaGV	Noctuidae	40.8	EU255577	169794	40.3
81	<i>Hyphantria cunea</i> granulovirus isolate Hc1	HycuGV-HC1	Noctuidae	39.3	MH923363	114825	40

---

82	<i>Mocis latipes</i> granulovirus	MolaGV	Noctuidae	38.3	KR011718	134272	40.5
83	<i>Mythimna unipuncta</i> granulovirus	MyunGV#8	Noctuidae	49.9	KX855660	144673	40.9
84	<i>Plodia interpunctella</i> granulovirus	PiGV	Pyralidae	44.2	KX151395	112536	40.2
85	<i>Plutella xylostella</i> granulovirus	PlxyGV	Plutellidae	40.7	AF270937	100999	40.3
86	<i>Spodoptera frugiperda</i> granulovirus isolate VG008	SpfrGV-VG008	Noctuidae	46.2	KM371112	140913	41.1
87	<i>Spodoptera litura</i> granulovirus isolate K1	SpliGV	Noctuidae	38.8	DQ288858	124121	39.4
88	<i>Trichoplusia ni</i> granulovirus	TnGV	Noctuidae	39.8	KU752557	175360	40.3
89	<i>Xestia c-nigrum</i> granulovirus	XcGV	Noctuidae	40.7	AF162221	178733	40.1
90	<i>Neodiprion abietis</i> nucleopolyhedrovirus	NeabNPV	Diprionidae	33.4	DQ317692	84264	35.3
91	<i>Neodiprion lecontei</i> nucleopolyhedrovirus	NeleNPV	Diprionidae	33.4	AY349019	81755	35.5
92	<i>Neodiprion sertifer</i> nucleopolyhedrovirus	NeseNPV	Diprionidae	33.8	AY430810	86462	35.5
93	<i>Culex nigripalpus</i> nucleopolyhedrovirus	CuniNPV	Culicidae	50.9	AF403738	108252	30.5

---

## APÊNDICE B – TABELA SUPLEMENTAR 2

**Table S2.** Percentage of both coding regions and intergenic spaces for each of the SperNPV-CNPSo165-related alphabaculovirus genomes.

<b>Virus isolate</b>	<b>Genome size (nt)</b>	<b>Coding regions [nt (%)]</b>	<b>Intergenic spaces [nt (%)]</b>
SfMNPV-19	132,565	121,668 (91.78)	10,897 (8.22)
SpexNPV-244.1	129,528	117,457 (90.68)	12,071 (9.32)
<b>SperNPV- CNPSo165</b>	<b>137,373</b>	<b>122,495 (89.17)</b>	<b>14,878 (10.83)</b>
SeMNPV-US1	135,611	120,478 (88.84)	15,133 (11.16)
SeMNPV-QD	128,525	111,097 (86.41)	17,468 (13.59)
SperNPV-251	149,090	126,612 (84.92)	22,478 (15.08)
SpltNPV-II	148,634	124,770 (83.95)	23,864 (16.05)

### APÊNDICE C – TABELA SUPLEMENTAR 3

**Table S3.** The unique ORFs (*i.e.* not found in any other baculovirus genomes) were subjected to HHpred and SMART in order to search for conserved domains (SCHULTZ, 1998; SÖDING *et al.*, 2005). SperNPV-ORF-22, ORF-44 and ORF-91 did not show a hit with any organism. SperNPV-ORF-6, ORF-9, ORF-22, ORF-44 and ORF-92 showed transmembrane domain.

ORF	NAME	Best hit	Evalue	SMART	SP (signal peptide)
6	SperNPV-ORF-6	<i>Lottia gigantea</i>	2.3e-09	<b>TMD</b>	No
9	SperNPV-ORF-9	<i>Salmo salar</i>	8.0e-09	<b>TMD</b>	No
10	SperNPV-ORF-10	<i>Steinernema glaseri</i>	0.0011	Não	No
22	SperNPV-ORF-22	-	-	<b>TMD</b>	No
24	NAD-glutamate dehydrogenase	<i>Trichomalopsis sarcophagae</i>	3.0e-07	Não	No
29	SperNPV-ORF-29	<i>Nematostella vectensis</i>	3.3e-09	Não	No
41	SperNPV-ORF-41	<i>Sarcophilus harrisii</i>	0.045	Não	No
44	SperNPV-ORF-44	-	-	<b>TMD</b>	No
45	SperNPV-ORF-45	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	0.22	Não	No
59	SperNPV-ORF-59	<i>Tenacibaculum sp. Bg11-29</i>	6.3e-07	Não	No
60	SperNPV-ORF-60	<i>Meloidogyne hapla</i>	1.7e-05	Não	No
91	SperNPV-ORF-91	-	-	Não	No
92	SperNPV-ORF-92	<i>Vibrio aerogenes CECT 7868</i>	0.41	<b>TMD</b>	No
93	SperNPV-ORF-93	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	0.1	Não	No
110	SperNPV-ORF-110	<i>Monodelphis domestica</i>	3.4e-12	Não	No
119	SperNPV-ORF-119	<i>Chitinophaga barathri</i>	0.87	<b>TMD</b>	No

