

Capítulo 3

Organización genómica y evolución

TERESA LUQUE

1. Introducción	74
2. Características generales de las ORFs de los baculovirus	75
3. Comparaciones del genoma de los baculovirus	76
3.1. Organización genómica	76
3.2. Comparación del contenido génico	78
3.2.1. Genes implicados en la replicación y transcripción del ADN	78
3.2.2. Genes estructurales	78
3.2.3. Otros genes	79
3.2.4. Genes repetidos de baculovirus o genes <i>bro</i> (<i>baculovirus repeated ORFs</i>)	82
3.2.5. Las regiones homólogas (<i>hrs</i> , <i>homologous regions</i>)	83
3.3. Orden de los genes de los baculovirus	85
4. Evolución de los baculovirus	86
4.1. Adquisición de nuevos genes	86
4.2. Análisis filogenético de los baculovirus	87
5. Agradecimientos	88
6. Bibliografía	88

1. Introducción

La primera contribución importante al conocimiento de la organización genómica y evolución de los baculovirus fue la identificación de la presencia de ADN (DNA) circular en las partículas víricas derivadas de los cuerpos de oclusión de un nucleopoliedrovirus (NPV) (BREINDL Y JIROVEC, 1935; SUMMERS Y ANDERSON, 1972; BURGESS, 1977). La introducción en los años 70 de los análisis mediante endonucleasas de restricción permitió la construcción de los primeros mapas físicos del genoma, facilitando la estimación de su longitud total y la distinción entre diversos baculovirus (ROHRMANN *et al.*, 1977; SMITH Y SUMMERS, 1978). Estos estudios se realizaron inicialmente con distintas variantes de *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) como por ejemplo E-2, L-1, HR-3 y C-6, evidenciando la existencia de heterogeneidad genómica intraespecífica (LEE Y MILLER, 1978, SMITH Y SUMMERS, 1978). Posteriormente, el desarrollo de las técnicas de biología molecular contribuyó en gran medida al avance del estudio de la organización genómica de los baculovirus. En los años 80, se secuenciaron algunos genes y porciones del genoma de diversos baculovirus, siendo el gen de la poliedrina de AcMNPV el primero en ser secuenciado (HOOF VAN IJDEKINGE *et al.*, 1983). En 1994 se publicó la secuencia completa del genoma de AcMNPV (AYRES *et al.*, 1994) y actualmente se dispone de la secuencia del genoma de otros cuatro NPVs y de un granulovirus (GV): *Orgyia pseudotsugata* NPV, OpMNPV (AHRENS *et al.*, 1997), *Lymantria dispar* NPV, LdMNPV (KUZIO *et al.*, 1999), *Bombyx mori* NPV, BmNPV (GOMI *et al.*, 1999), *Spodoptera exigua* NPV, SeMNPV (IJKEL *et al.*, 1999) y *Xestia c-nigrum* GV, XcGV (HAYAKAWA *et al.*, 1999). Este tipo de estudio se ha visto facilitado por el reciente avance de las técnicas de secuenciación de ADN y el desarrollo de programas informáticos de análisis de secuencias.

La información proporcionada por las secuencias del genoma de los baculovirus es de gran importancia y de suma utilidad para los estudios de su organización genómica y evolución (POSSEE Y ROHRMANN, 1997). Por ejemplo, el análisis del contenido genómico puede facilitar la caracterización de variantes genotípicas, frecuentemente observables en poblaciones de baculovirus aisladas del campo y cuyo mantenimiento parece ser importante (WEITZMANN *et al.*, 1992; MUÑOZ *et al.*, 1999). Las diferencias en la secuencia de ADN entre variantes genotípicas pueden ser debidas a la duplicación de porciones del genoma, a delecciones de secuencias, a inserciones, etc. Algunos de estos cambios pueden haberse originado mediante la inserción de elementos transponibles del huésped en el genoma viral (FRIESEN, 1993; JEHL *et al.*, 1998). La comparación del contenido genético de los distintos baculovirus aporta una visión inicial sobre qué genes están conservados en todos ellos y por tanto, son probablemente fundamentales para la supervivencia del virus. Estos genes constituyen la esencia de ser un baculovirus y pueden ser los más apropiados para realizar análisis filogenéticos. En cambio, aquellos genes que sólo se encuentran en una determinada especie de virus posiblemente están implicados en determinar características únicas de dicha especie, como por ejemplo la especificidad de huésped y la virulencia.

Otro tipo de análisis de las secuencias del genoma de los baculovirus se basa en que las distintas ordenaciones génicas pueden codificarse como caracteres filogené-

ticos y utilizarse para su estudio evolutivo. Por ejemplo, la ordenación de los genes mitocondriales de mamíferos se está utilizando para inferir sus relaciones filogenéticas (BOORE AND BROWN, 1998). Por otra parte, el estudio comparativo de genomas de mamíferos ha aportado información sobre el origen y desarrollo de diversas enfermedades hereditarias (O'BRIEN *et al.*, 1999). Actualmente la clasificación de los baculovirus carece en gran medida de estudios filogenéticos exhaustivos que ayuden a la comprensión de la historia evolutiva de estos organismos. A medida que se conozcan más secuencias de genomas de baculovirus, las comparaciones podrán ser más exhaustivas e informativas.

2. Características generales de las ORFs de los baculovirus

El genoma de los baculovirus está formado por una doble cadena de ADN circular que oscila entre 90 y 160 kilobases (FUNK *et al.*, 1997). Se trata de genomas grandes en comparación con los de otros virus, aunque mucho más pequeños que los genomas de procariotas o eucariotas. La existencia de esta gran variación en el tamaño del genoma de los baculovirus sugiere que algunos de ellos carecen de genes presentes en otros miembros de la familia. La naturaleza de su cápsida permite estas grandes variaciones naturales, lo que ha sido aprovechado en algunas técnicas de ingeniería genética para la inserción de material genético ajeno en baculovirus.

Los genomas de los baculovirus totalmente secuenciados hasta el momento contienen entre 140 y 180 pautas abiertas de lectura (ORFs, *open reading frames*) seleccionadas según los criterios de solapamiento mínimo y de longitud igual o superior a 150 nucleótidos (Tabla 1). En el proceso de selección de ORFs no se consideraron aquellas de longitud inferior a 150 nucleótidos y cuando dos ORFs estaban totalmente solapadas se seleccionó la más grande. Tampoco no se tuvo en cuenta en ningún caso el procesamiento de intrones (escisión o *splicing*), pues hasta el momento sólo se ha descrito en el gen *ic-0/ie-1* (AcMNPV ORF141 o Ac141 y Ac147, respectivamente) (CHISHOLM Y HENNER, 1988; KOVACS *et al.*, 1991). Sin embargo, esta aproximación no permite la identificación de genes que no se traducen, como por ejemplo los ácidos ribonucleicos de transferencia (ARNt o tRNA). Por convenio, la orientación del genoma circular de los baculovirus se determina mediante la posición relativa del gen de la proteína del cuerpo de inclusión (poliedrina, POLH/granulina, Ac8) y el gen *p10* (Ac137) (VLAK Y SMITH, 1982). En la mayoría de baculovirus secuenciados, el origen del genoma se consideró en el gen de la poliedrina/granulina (ORF1), aunque por ejemplo en AcMNPV el origen se estableció en la región homóloga 1, *hr1*, y por tanto, el gen de la poliedrina es la ORF8 (AYRES *et al.*, 1994).

Las ORFs se encuentran en cualquiera de las dos posibles orientaciones y suelen estar separadas por regiones intergénicas cortas, solapándose a menudo la señal de terminación de traducción con la señal de poliadenilación del transcrito, AAUAAA (AYRES *et al.*, 1994). De forma similar, los elementos promotores de las ORFs pueden encontrarse en la secuencia codificante de otra ORF. Por ejemplo, las regiones reguladoras de los genes *cg30*, *lef-4* y *lef-6* (Ac88, Ac90 y Ac28, respectivamente) en

Tabla 1. Características del genoma de distintos baculovirus.

	AcMNPV	BmNPV	OpMNPV	LdMNPV	ScMNPV	XcGV
Tamaño (kb)	133.9	128.4	132.0	161.0	135.6	178.7
Nº de ORFs	154	143	152	163	139	181
G+C (%)	40.7	40.4	55.1	57.5	43.8	40.7
Nº de genes <i>bro</i>	1	5	2	16	0	7
Nº de <i>hrs</i>	8	7	5	13	6	8

AcMNPV se hallan dentro de la región codificante de los respectivos genes adyacentes (PASSARELLI Y MILLER, 1993, 1994; DURANTEL *et al.*, 1998).

Las ORFs no parecen estar agrupadas ni según su función ni según su patrón de expresión temporal. De hecho, se han observado algunas agrupaciones pero se desconoce su significado funcional. Por ejemplo, tres genes implicados en la regulación de la expresión génica, *ie-1*, *ie-2* y *pe38* (Ac147, Ac151 y Ac153, respectivamente), se encuentran en la misma región genómica (95-100 mu) de AcMNPV, mientras que otros genes involucrados en los mismos procesos se hallan en otras regiones del genoma (AYRES *et al.*, 1994). El hecho de que tampoco exista una evidente agrupación según la expresión temporal sino que genes tardíos se encuentran entre genes tempranos, podría tener una función reguladora de la expresión génica. Muchas regiones del genoma de los baculovirus se transcriben en ARNs múltiples y solapados y probablemente los ARNs que van en sentido contrario, ARNs antisentido, están implicados en la regulación de la expresión génica mediante la formación de dúplex de ARN (OOI Y MILLER, 1990).

La comparación mediante programas informáticos de las ORFs seleccionadas con las bases de datos, indica que algunas codifican proteínas de funciones conocidas mientras que otras ORFs no presentan ninguna similitud con las secuencias actualmente disponibles. Aunque el análisis informático puede proporcionar información sobre la función y el patrón de expresión temporal de un gen, siempre es necesario confirmar experimentalmente cualquier hipótesis. Por ejemplo, mediante la inactivación de un gen por inserción de secuencias heterólogas o por delección se pueden observar las consecuencias fenotípicas de la ausencia del gen, primer paso para la determinación de su función. En el caso de genes esenciales, un análisis equivalente es posible mediante el uso de mutantes termosensibles (O'REILLY *et al.*, 1994).

3. Comparaciones del genoma de los baculovirus

3.1. Organización genómica

Los genomas de los baculovirus totalmente secuenciados hasta el momento tienen tamaños relativamente similares, aunque los de AcMNPV, BmNPV,

OpMNPV y SeMNPV (133.894 pb, 128.413 pb, 131.990 pb y 135.612 pb, respectivamente) son ligeramente más pequeños que los de LdMNPV y XcGV (161.046 pb y 178.733 pb, respectivamente). El número de ORFs de 150 nucleótidos o más en cada especie varía en proporción al tamaño de su genoma (Tabla 1).

El contenido de G+C presenta diferencias significativas entre los distintos baculovirus y no parece estar correlacionado con el tamaño del genoma: AcMNPV, BmNPV, SeMNPV y XcGV tienen un 40-44% de G+C, mientras que OpMNPV y LdMNPV tienen un contenido superior (55 y 58%, respectivamente) (Tabla 1). Estas diferencias se reflejan en el uso de codones (*codon usage*) y pueden tener un sentido adaptativo que todavía no ha sido esclarecido. En general, las secuencias codificantes de los baculovirus tienen un contenido de G+C superior al de las secuencias intergénicas. Por ejemplo, las regiones codificantes de AcMNPV y BmNPV tienen un 41.6% de G+C, mientras que las intergénicas tienen aproximadamente un 30%. Lo mismo ocurre en el genoma de OpMNPV y LdMNPV donde las regiones codificantes presentan un 56.9 y 59.6% de G+C, respectivamente, mientras que las regiones intergénicas presentan sólo un 38.2 y 40.4%, respectivamente (KUZIO *et al.*, 1999). Por tanto, no es de extrañar que los genes de los baculovirus tengan normalmente secuencias promotoras ricas en A+T. Por ejemplo, los genes transcritos temprano mediante la ARN polimerasa II de la célula huésped tienen a menudo secuencias promotoras TATA, mientras que los genes tardíos tienen secuencias promotoras TAAG situadas frecuentemente en zonas ricas en A+T (AYRES *et al.*, 1994).

La disponibilidad de las secuencias genómicas completas de diversos baculovirus permite evidenciar las semejanzas y las diferencias en su contenido genético. Los genomas de los cinco NPVs secuenciados suman un total de 245 ORFs distintas, de las cuales 85 se encuentran conservadas en todos ellos (IJKEL *et al.*, 1999) y sólo 64 se hallan también presentes en el genoma de XcGV (HAYAKAWA *et al.*, 1999). En los análisis de comparación de genomas en baculovirus generalmente se utiliza la secuencia de AcMNPV como prototipo (BLISSARD *et al.*, 2000). AcMNPV y BmNPV son los baculovirus más estrechamente emparentados, codificando las ORFs homólogas proteínas que presentan una media del 93% de aminoácidos idénticos (identidad aminoacídica, ID) (GOMI *et al.*, 1999). En cambio, AcMNPV presenta una media del 56% de ID con sus proteínas homólogas de OpMNPV y del 41% con sus homólogas de LdMNPV y SeMNPV (AHRENS *et al.*, 1997; KUZIO *et al.*, 1999; IJKEL *et al.*, 1999). Los valores más bajos de ID de proteínas homólogas de AcMNPV se obtienen con XcGV, con una media del 33% (HAYAKAWA *et al.*, 1999). Los genes más conservados en los distintos baculovirus son los de la poliedrina/granulina y la ubiquitina (ubi, Ac35). La poliedrina presenta valores superiores al 80% de ID entre los NPVs, mientras que la poliedrina de AcMNPV y la granulina de XcGV tienen sólo un 54% de ID. La ubiquitina de AcMNPV tiene un 84% de ID con la proteína homóloga de OpMNPV, un 70% con la de LdMNPV y SeMNPV, y un 79% con la de XcGV. Existen otras ORFs que también están altamente conservadas en los baculovirus totalmente secuenciados, como por ejemplo el gen de la *cathepsina* (*cath*, Ac127) y el gen *lef-9* (Ac62) que

codifican proteínas que presentan para las distintas especies entre un 60 y 90% de ID.

3.2. Comparación del contenido génico

3.2.1. Genes implicados en la replicación y transcripción del ADN

La mayoría de los genes implicados en la replicación del ADN viral y en la transcripción de los genes tardíos se encuentran presentes en todos los baculovirus secuenciados hasta el momento. Los genes tempranos son transcritos por la maquinaria de transcripción de la célula huésped, aunque la presencia de activadores de transcripción de origen viral es requerida para algunos de ellos (ver Capítulo 5). Los genes esenciales para la replicación del ADN están moderadamente conservados: ADN polimerasa (*dnapol*, Ac65), helicasa (*hel*, Ac95), *lef-1* (*late expression factor-1*, factor de expresión tardía-1, Ac14) y *lef-2* (Ac6) codifican proteínas que presentan entre un 22 y 32% de ID, mientras que la proteína codificada por el gen *lef-3* (Ac67) se encuentra mucho menos conservada (Ijkel *et al.*, 1999). Esta relativa baja identidad entre estas proteínas podría explicar la especificidad del proceso de replicación del ADN vírico. Ninguno de los genes necesarios para la estimulación de la replicación en AcMNPV y BmNPV, *ie-2*, *pe38*, *lef-7* (Ac125) y *p35* (Ac135) se halla presente en el genoma de LdMNPV, SeMNPV o XcGV.

Los genes necesarios para la transactivación de la transcripción de genes tempranos, tales como el *ie-1* y el *me53* (Ac139), están poco conservados, mientras que los implicados en la activación de la transcripción de genes tardíos, *lef 4-6* y *8-11*, *39K*, *p47*, *vlf-1* (Ac90, Ac99, Ac28, Ac50, Ac62, Ac53a, Ac37, Ac36, Ac40 y Ac77, respectivamente), están en general más conservados, codificando proteínas que presentan una media del 31% de ID entre los NPVs y XcGV. El gen más conservado de todos ellos es el *lef-9*, mientras que el gen *lef-6* se halla ausente en el genoma de XcGV (HAYAKAWA *et al.*, 1999).

En LdMNPV y XcGV existen otros dos genes que no estimulan la replicación transitoria del ADN pero que podrían estar implicados en los procesos de recombinación o reparación del ADN: el gen *helicasa-2* (*hel2*, Ld50), que presenta similitudes con una helicasa mitocondrial de levadura llamada *pif1* y el gen *ADN ligasa* (*dnalig*, Ld22), que presenta gran similitud con la ligasa del virus de la vacuna (Poxviridae) (PEARSON Y ROHRMANN, 1998; HAYAKAWA *et al.*, 1999; KUZIO *et al.*, 1999).

3.2.2. Genes estructurales

La proteína estructural más conservada en los NPVs y los GVs es la poliedrina/granulina, el mayor componente de los cuerpos de oclusión (con un 54% de ID entre XcGV y AcMNPV), seguida por ODV-E66 (Ac46) y ODV-E18 (Ac143) (con un 43 y 42% de ID, respectivamente, entre XcGV y AcMNPV) (HAYAKAWA *et al.*, 1999). A pesar de que los viriones de los NPVs y los GVs son similares a nivel estructural y bioquímico, diversos genes homólogos presentan niveles bajos de conservación, pudiéndose observar en sus secuencias aminoácídicas inserciones

y deleciones. Entre los genes estructurales poco conservados se encuentra la *p78/83*, también llamada *ORF1629* (Ac9), componente esencial de los viriones (VIALARD *et al.*, 1993) y la *p10*, posiblemente implicada en la morfogénesis de los cuerpos de oclusión y en la ruptura del núcleo (VAN OERS Y VLAK, 1997).

La GP64 (Ac128) es una glicoproteína mayoritaria en la cubierta de los viriones brotados (BV, *budded virus*) de AcMNPV, BmNPV y OpMNPV, donde su función es esencial para la propagación de la infección de célula a célula y desde el intestino del insecto al hemocele (MONSMA *et al.*, 1996). Sorprendentemente, el gen *gp64* no se encuentra en los genomas de LdMNPV, SeMNPV ni XcGV. Sin embargo, en estas especies existe una ORF (Ld130, Se8 y Xc27) que tiene potencial codificador para una proteína que podría estar realizando una función equivalente a la de GP64, pues posee una señal N-terminal y un dominio transmembranal característicos de proteínas receptoras de transmembrana (KUZIO *et al.*, 1999; IJKELE *et al.*, 1999; HAYAKAWA *et al.*, 1999).

3.2.3. Otros genes

Además de los genes estructurales y de los implicados en la replicación y transcripción del ADN, los baculovirus poseen otros genes que les permiten reducir su dependencia de la célula huésped o les proporcionan alguna ventaja selectiva. Aunque de alguno de ellos se desconoce su función exacta, estos genes pueden afectar a la replicación viral dentro de la célula infectada o bien influir en la propagación vírica a nivel del organismo. Algunos de estos genes se encuentran muy conservados en las distintas especies, como por ejemplo el gen de la ubiquitina que codifica una proteína muy abundante y conservada en todos los eucariotas. Su función principal en la célula consiste en señalar la degradación de proteínas por el proteosoma 26S (HOCHSTRASSER, 1996). La degradación se señala mediante la unión covalente de una cadena de moléculas de ubiquitina a la proteína por degradar. La ubiquitina de baculovirus es la que presenta la divergencia más elevada respecto a la de animales (la ubiquitina de AcMNPV y la animal comparten sólo un 76% de sus residuos). El gen de AcMNPV es de tipo tardío y se expresa abundantemente, lo que sugiere que tiene una función estructural (GUARINO *et al.*, 1995). Esta proteína no es esencial para la replicación del virus y en estudios *in vitro* se ha visto que activa la degradación de proteínas en sólo un 40% del nivel alcanzado por la ubiquitina eucariota (HAAS *et al.*, 1996). En general, la función de la ubiquitina viral es poco conocida y se desconoce también a qué proteínas se une.

El gen *superóxido dismutasa* (*sod*, Ac31) también está altamente conservado en los distintos baculovirus secuenciados. La proteína SOD celular forma parte de las defensas enzimáticas contra la toxicidad del oxígeno y se halla presente en la mayoría de los organismos aeróbicos. Sin embargo, la SOD de baculovirus tiene una función desconocida. El gen *sod* de AcMNPV no es esencial, expresándose tarde y en baja abundancia durante el proceso de infección (TOMALSKI *et al.*, 1991).

Muchos virus activan los procesos de suicidio celular muy al inicio del proceso de infección, lo que puede tener efectos negativos para la replicación y propaga-

ción del virus. Por esta razón, los baculovirus poseen genes cuyos productos están implicados en la inhibición del suicidio celular, concretamente el gen *p35* y los genes *iap* (inhibidores de la apoptosis) (Tabla 2). La P35 es una inhibidora de proteasas y sólo se ha descrito en AcMNPV y BmNPV. Esta proteína también puede inhibir la apoptosis en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (HAY *et al.*, 1994; SUGIMOTO *et al.*, 1994). En otras especies de baculovirus se ha descrito el inhibidor de la apoptosis IAP-3 (Op35), el cual probablemente actúa en un momento más precoz de las rutas de apoptosis que la P35, aunque se desconocen los detalles de su modo de acción (CLEM *et al.*, 1996; CLEM, 1997). El gen *iap-3* fue inicialmente descrito en *Cydia pomonella* GV, CpGV, mediante estudios de complementación de mutantes *p35* de AcMNPV (CROOK *et al.*, 1993). La existencia de genes *iap* en especies tan distintas como baculovirus, *Drosophila* y humanos (HAY *et al.*, 1995; ROTHE *et al.*, 1995; DUCKETT *et al.*, 1996) sugiere que están implicados en la regulación de la apoptosis en distintos sistemas celulares. En AcMNPV y BmNPV también existen dos genes *iap*, *iap-1* (Ac27) e *iap-2* (Ac71), de función desconocida (GRIFFITHS *et al.*, 1999). Las proteínas IAP codificadas por estos genes no pueden compensar la ausencia de P35 en células de *Spodoptera frugiperda*, por lo que se cree que no pueden inhibir la apoptosis. Sin embargo, se ha propuesto que la Ac-IAP-1 podría inhibir la apoptosis en otros tejidos celulares (CLEM *et al.*, 1996). Otro miembro de la familia *iap*, el gen *iap-4* (Op106), fue inicialmente descrito en el genoma de OpMNPV, pero se trata de un gen truncado y de función desconocida (AHRENS *et al.*, 1997). La presencia de múltiples copias de genes *iap* es probablemente el resultado de procesos de duplicación génica ocurridos a lo largo de la evolución de los baculovirus y/o de repetidos procesos de adquisición de estas secuencias.

Todos los baculovirus actualmente secuenciados poseen genes que codifican proteínas quinasas y proteínas fosfatasa, las cuales están implicadas en los procesos de fosforilación y defosforilación de muchas proteínas. Estos mecanismos permiten la regulación de la actividad de una proteína a nivel postraducciona y son muy comunes en muchos sistemas biológicos. Esta forma de control tiene también una función importante en los procesos de infección de los baculovirus ya que muchas proteínas víricas están fosforiladas, como por ejemplo la IE-1 (implicada en la replicación y transcripción del ADN) y la proteína estructural P78/83 (VIALARD Y RICHARDSON, 1993; CHOI Y GUARINO, 1995). En baculovirus se ha descrito la existencia de dos proteínas quinasas: la PK1 (Ac10), conservada en todos los baculovirus secuenciados hasta el momento, y la PK2 (Ac123), sólo presente en AcMNPV y BmNPV y cuya función no es esencial (CHEN Y THIEM, 1997). También se ha descrito la presencia de dos proteínas tirosina fosfatasa de especificidad dual, dsPTP, que defosforilan residuos tirosina y serina/reonina. La PTP-1 se halla presente en AcMNPV (Ac1), BmNPV y OpMNPV, y la PTP-2 en OpMNPV (Op9) y SeMNPV. Estas dos dsPTP pertenecen a dos subfamilias distintas y se hallan ausentes en el genoma de LdMNPV y XcGV (KUZIO *et al.*, 1999; HAYAKAWA *et al.*, 1999).

En OpMNPV, LdMNPV y SeMNPV se han descrito varios genes implicados en el metabolismo de los nucleótidos, concretamente los que codifican las subunida-

Tabla 2. Genes inhibidores de la apoptosis en distintos baculovirus. + indica presencia y - ausencia.

	AcMNPV	BmNPV	OpMNPV	LdMNPV	SeMNPV	XcGV
<i>p35</i>	+	+	-	-	-	-
<i>iap-1</i>	+	+	+	-	-	-
<i>iap-2</i>	+	+	+	+	+	-
<i>iap-3</i>	-	-	+	+	+	+
<i>iap-4</i>	-	-	+	-	-	-

des grande y pequeña de la ribonucleótido reductasa (*rr1*, Op32 y *rr2*, Op34) y el gen *dutpasa* (Op31). La expresión de la ribonucleótido reductasa de los virus les permite sintetizar desoxirribonucleótidos (dNTPs), pudiendo así replicarse en células que no están en división y que por tanto tienen inactivas las rutas de síntesis de dNTPs. Sin embargo, la producción de dUTP, producto intermedio de esta cadena biosintética, puede ser nociva ya que éste es mutagénico cuando se incorpora en el ADN. Por tanto, la dUTPasa es una enzima muy importante porque convierte dUTP en dUMP, un precursor de la síntesis de dTTP que no se produce directamente por la ruta de la ribonucleótido reductasa (ELLEDGE *et al.*, 1992). En LdMNPV existe un segundo gen *rr2* (*rr2b*, Ld120) que está más relacionado con su homólogo en células eucariotas (KUZIO *et al.*, 1999). El gen *rr2* de SeMNPV presenta más similitudes en cuanto a su localización en el genoma y a la identidad proteica con Ld-*rr2b* que con Op-*rr2* y Ld-*rr2a*. También el gen *dutpasa* de SeMNPV está más relacionado con su homólogo en LdMNPV que con el de OpMNPV (IJKEL *et al.*, 1999). Por contra, ninguno de estos genes se encuentra presente en el genoma de AcMNPV, BmNPV o XcGV.

Los genes *cath* y *chiA* (Ac126), que codifican una cisteína-proteasa y una quitinasa, respectivamente, se encuentran conservados en todos los baculovirus actualmente secuenciados. La cutícula del insecto está formada principalmente por fibras de quitina envueltas en una matriz proteica, por lo que se requieren proteasas y quitinasas para su destrucción. La acción conjunta de estas proteínas permite la desintegración de dicha cutícula, facilitando la diseminación de los cuerpos de oclusión (OB, *occlusion bodies*) (HAWTIN *et al.*, 1995, 1997). Por tanto, las cathepsinas y las quitinasas realizan una función muy importante en la propagación vírica a nivel del organismo y esto se refleja en su alto grado de conservación (47 y 62% de ID, respectivamente, entre XcGV y AcMNPV) (HAYAKAWA *et al.*, 1999).

Otro gen también conservado en los NPVs y los GVs es el denominado *conotoxin-like* (*ctl*, Ac3), que presenta motivos comunes con la familia de las conotoxinas. Sin embargo, *ctl* se halla ausente en el genoma de BmNPV y SeMNPV. Este gen codifica un péptido pequeño, rico en cisteínas que concretamente presenta similitudes con las omega-conotoxinas, una familia de antagonistas de los canales de calcio aisladas del veneno de gasterópodos marinos del género *Conus* (OLIVERA

et al., 1994). Debido a esta similitud se cree que la proteína CTL participa en la regulación de los niveles de calcio durante la infección. Actualmente se desconoce la función biológica de esta proteína, aunque considerando que las conotoxinas son toxinas paralizadoras, la CTL podría estar implicada en la inducción de alguna forma de parálisis de los insectos infectados (ELDRIDGE *et al.*, 1992). En AcMNPV y XcGV sólo se encuentra el gen *ctl-1*, mientras que en OpMNPV y LdMNPV existen dos genes *ctl* (*ctl-1*, Op136 y *ctl-2*, Op30), que codifican proteínas que presentan un 78 y 53% de ID, respectivamente (Kuzio *et al.*, 1999).

El gen *enhancina* (*vef*, *viral enhancing factor*) también influencia la propagación del virus a nivel del organismo. La VEF es una proteína grande que facilita la infección de los baculovirus mediante la disrupción de la membrana peritrófica de los insectos, permitiendo el acceso de los viriones a la superficie de las células intestinales (DERKSEN Y GRANADOS, 1988; WANG Y GRANADOS, 1998). Este gen sólo se halla presente en LdMNPV, XcGV y otros baculovirus cuyo genoma no ha sido totalmente secuenciado, como son *Trichoplusia ni* GV, TnGV, *Pseudaletia unipuncta* GV, PuGV, o *Helicoverpa armigera* GV, HaGV (HASHIMOTO *et al.*, 1991, ROELVINK *et al.*, 1995). En LdMNPV existen dos genes *vef* (Ld65 y Ld160) y en XcGV cuatro (Xc150, Xc152, Xc154 y Xc166), presentando bajas similitudes intra-específicas (HAYAKAWA *et al.*, 1999).

La función biológica de muchos de los genes mencionados es desconocida pero parece obvio pensar que si se hallan conservados en muchas especies es porque aportan alguna ventaja selectiva. La comparación del genoma de los baculovirus totalmente secuenciados puede aportar información indirecta sobre la función de los genes, pues los que están conservados en todas las especies es probable que estén implicados en procesos comunes a todos los baculovirus.

3.2.4. Genes repetidos de baculovirus o genes *bro* (baculovirus repeated ORFs)

Los genes *bro* representan el caso más asombroso de genes multicopia existente en los genomas de baculovirus (Figura 1). El número de copias varía según la especie, siendo de momento LdMNPV, con 16 genes *bro*, la especie con el número más elevado de copias (Kuzio *et al.*, 1999). En BmNPV existen cinco genes *bro*, en OpMNPV dos, en XcGV siete y en AcMNPV sólo existe una copia (Ac2), mientras que en SeMNPV no parece clara la existencia de ningún representante de esta familia génica (IJKEL *et al.*, 1999) (Tabla 1). A pesar de que se han descrito genes *bro* en muchos baculovirus su función se desconoce por completo. El estudio de los cinco genes *bro* de BmNPV indica que todos ellos se transcriben temprano y que para ello se requiere la presencia de un(os) factor(es) vírico(s) (KANG *et al.*, 1999).

Los genes *bro* presentan grandes variaciones de tamaño (por ejemplo Ld-*bro-c*, 528 pb; Xc-*bro-e*, 237 pb), siendo la región 5' la que presenta el grado de conservación más elevado. Estos genes pueden dividirse en cuatro clases según las relaciones de las regiones más variables (Kuzio *et al.*, 1999). Los genes más conservados son Ac-*bro*, Bm-*bro-d* y Ld-*bro-n* los cuales codifican putativas proteínas

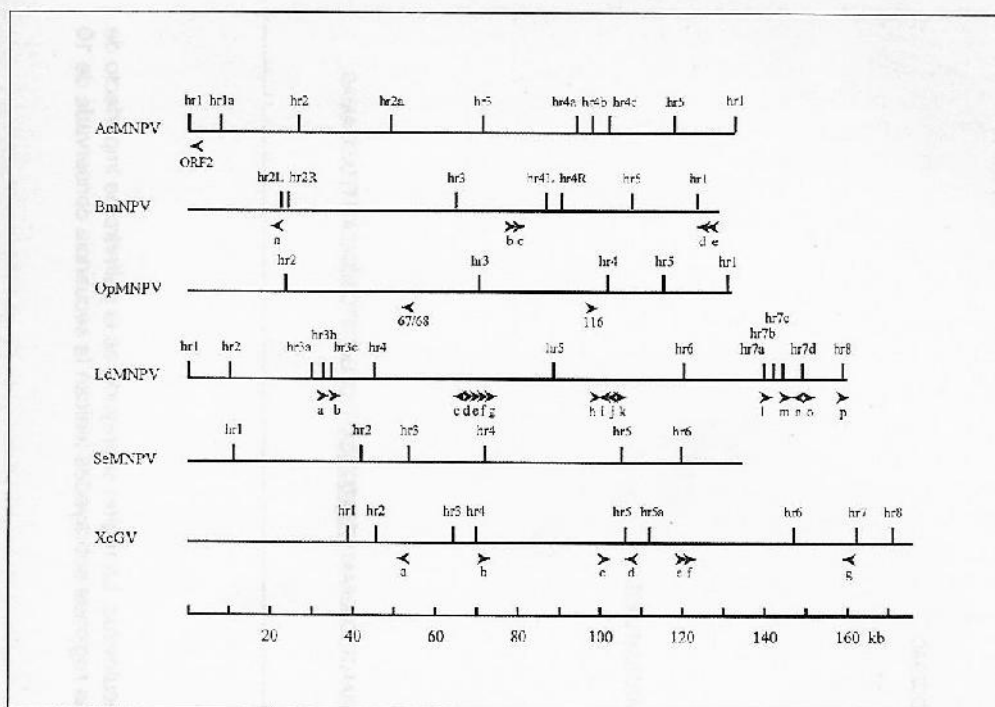


Figura 1. Comparación de la distribución de los genes *bro* y las secuencias *hr* en el genoma de distintos baculovirus. Las flechas indican la posición y orientación de los genes *bro*.

que presentan un 82% de ID (Kuzio *et al.*, 1999). La comparación de los miembros de esta familia génica sugiere que han tenido lugar diversos procesos de duplicación génica independientemente en los distintos baculovirus (Kuzio *et al.*, 1999; Gomi *et al.*, 1999). Los genes *bro* de los baculovirus no son un caso aislado de familia multigénica en virus. Recientemente, se ha descrito también la existencia de genes multicopia en especies de otras familias víricas como por ejemplo en *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus (MsEPV) (Afonso *et al.*, 1999).

3.2.5. Las regiones homólogas (*hrs*, homologous regions)

Una característica interesante de todos los baculovirus secuenciados hasta el momento es la presencia de regiones homólogas, *hrs*, situadas a lo largo de todo el genoma (Figura 1). También se ha descrito la presencia de *hrs* en el genoma de otros baculovirus como por ejemplo *Choristoneura fumiferana* MNPV (CfMNPV) (Xie *et al.*, 1995) y *Anticarsia gemmatilis* MNPV (AgMNPV) (García-Maruniak *et al.*, 1996). Las *hrs* están compuestas por secuencias repetidas que incluyen tanto repeticiones directas como secuencias palindrómicas imperfectas. El número de *hrs* varía según la especie y no en relación al tamaño del genoma (Tabla 1). La mayoría de las *hrs* se encuentran en regiones no codificantes del genoma y su estructura presenta variaciones en las diversas especies. Por ejem-

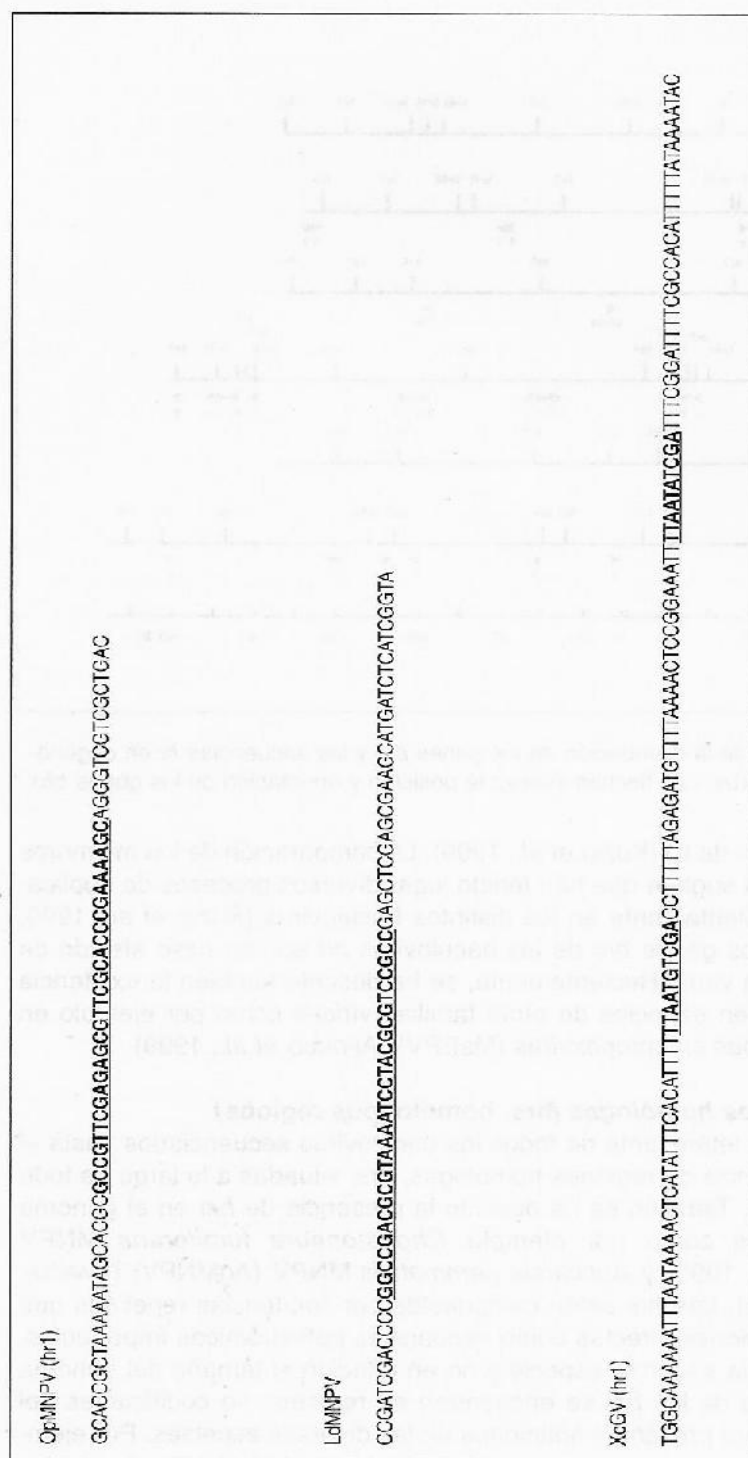


Figura 2. Secuencias repetidas en las *hrs* de distintas especies de baculovirus. La región subrayada es el palíndromo imperfecto de 30 pb en las *hrs* de OpMNPV y LdMNPV. En la secuencia de XcGV las regiones subrayadas indican la secuencia conservada de 10 pb.

plo, las *hrs* de AcMNPV, OpMNPV y LdMNPV contienen entre 1 y 10 repeticiones directas de una secuencia que incluye un palíndromo imperfecto de 30 pb (COCHRAN Y FAULKNER, 1983; PEARSON Y ROHRMANN, 1995; AYRES *et al.*, 1994; AHRENS *et al.*, 1997; KUZIO *et al.*, 1999). En cambio, las *hrs* de XcGV contienen entre 3 y 6 repeticiones imperfectas directas de unos 120 pb, incluyendo cada una de ellas dos secuencias altamente conservadas de 10 pb que pueden encontrarse en la misma orientación o en orientaciones opuestas (Figura 2) (HAYAKAWA *et al.*, 1999).

En AcMNPV, OpMNPV y SeMNPV, las *hrs* actúan como orígenes de replicación del ADN en estudios de replicación transitoria (PEARSON *et al.*, 1992; Kool *et al.*, 1995; AHRENS *et al.*, 1995; BROER *et al.*, 1998). En cambio, las *hrs* de LdMNPV deben estar cerca de una secuencia rica en A+Ts para poder activar la replicación (PEARSON Y ROHRMANN, 1995). Las *hrs* también actúan como activadores de la transcripción de genes tempranos mediada por la ARN polimerasa II. Esta activación depende de la presencia de la proteína IE-1, la cual se une a las *hrs* (LEISY *et al.*, 1995; RODEMS Y FRIESEN, 1995; PEARSON Y ROHRMANN, 1997).

Una característica interesante de las *hrs* es que la posición de algunas de ellas parece estar conservada en relación a determinados genes de baculovirus. En concreto, la *hr3* de AcMNPV se halla adyacente a la ORF83 y en BmNPV, OpMNPV y LdMNPV también se encuentra una *hr* adyacente a la correspondiente ORF homóloga a Ac83 (AHRENS *et al.*, 1997; GOMI *et al.*, 1999; KUZIO *et al.*, 1999). Parece probable pues, que las *hrs* estuviesen presentes en un baculovirus ancestral. La comparación de las *hrs* indica la existencia de más similitud intraespecífica que interespecífica, de manera que muy probablemente su amplificación ha estado altamente relacionada con la conservación de su función. Por ejemplo, las *hrs* de una determinada especie podrían estar coevolucionando a través de su interacción con alguna proteína vírica que se une a ellas como por ejemplo el activador de la transcripción IE-1. El mantenimiento de las *hrs* en genomas diversos apoya la idea que realizan una función importante en el ciclo biológico de los baculovirus.

3.3. Orden de los genes de los baculovirus

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de diversos baculovirus permite realizar comparaciones del orden relativo de los genes. Este tipo de estudio se ha llevado a cabo entre los distintos NPVs secuenciados hasta el momento e indica que el orden de los genes de la región central, considerando el genoma de los baculovirus linear y con origen en el gen de la poliedrina, está altamente conservado (JIKEL *et al.*, 1999). También se han podido distinguir distintos grupos de genes que presentan el mismo orden en los cinco NPVs secuenciados. La comparación del orden de los genes entre distintos baculovirus indica que estos genomas han sufrido inversiones, translocaciones, duplicaciones, inserciones y deleciones a lo largo de la evolución. En general, el orden de los genes está muy conservado en AcMNPV, BmNPV y OpMNPV pero bastante menos en

LdMNPV. En cambio, SeMNPV presenta una organización genómica más particular y más parecida a LdMNPV que a AcMNPV, BmNPV u OpMNPV (IJKEL *et al.*, 1999). Esta observación está en concordancia con los análisis filogenéticos de genes individuales tales como *egt* (Ac15) y *lef-2* en los que SeMNPV se encuentra más próximo a LdMNPV (CHEN *et al.*, 1997, 1999; HU *et al.*, 1997). Así pues, el orden de los genes puede utilizarse como un marcador filogenético para el estudio de las relaciones ancestrales de los baculovirus.

4. Evolución de los baculovirus

4.1. Adquisición de nuevos genes

El análisis del contenido genómico de los baculovirus indica que estos poseen secuencias homólogas a genes que se encuentran en otros grupos de organismos tales como eucariotas, procariotas y otras familias de virus, lo que sugiere la existencia de un flujo de genes entre especies filogenéticamente muy alejadas. Los mecanismos y la frecuencia con que los baculovirus adquieren nuevos genes son aspectos interesantes de su evolución, aunque se trata de procesos en general poco conocidos. Entre los genes con un supuesto origen en el genoma del huésped se encuentra el gen *egt* (ecdisona UDP-glucosil transferasa) que pertenece a la familia de las UDP-glucosil transferasas de la que se han descrito diversos miembros en insectos (por ejemplo en *Manduca sexta*, THOMPSON *et al.*, 1987). Este gen se encuentra en un gran número de baculovirus incluyendo representantes de los dos subgrupos por lo que se cree que el gen *egt* estaba presente en el genoma del ancestro común de los NPVs y los GVs (O'REILLY, 1997). Otros ejemplos son el gen *sod*, superóxido dismutasa, y los genes *iap*. Un posible mecanismo de adquisición de nuevos genes podría ser mediante la incorporación de elementos transponibles procedentes del huésped (FRIESEN, 1993; JEHLE *et al.*, 1998).

Otros genes con un supuesto origen en otras familias de virus, levaduras o bacterias se han adquirido mediante mecanismos desconocidos. Entre los genes que probablemente proceden de otras familias víricas se encuentran el gen estructural *gp64*, relacionado con una glicoproteína del virus Thogoto (Orthomyxoviridae) (MORSE *et al.*, 1992), el gen *gp37* (Ac64), homólogo al gen denominado *spindlin* de los entomopoxvirus (Poxviridae) (VIALARD *et al.*, 1990) y un gen que codifica una ligasa en LdMNPV y XcGV, que presenta similitudes con un gen de los poxvirus (PEARSON Y ROHRMANN, 1998; HAYAKAWA *et al.*, 1999; KUZIO *et al.*, 1999). Por otro lado, en LdMNPV y XcGV se ha descrito la existencia de un gen que codifica una helicasa que presenta similitudes con una helicasa mitocondrial de levaduras llamada *pif1* (KUZIO *et al.*, 1999; HAYAKAWA *et al.*, 1999). También el gen *vlf-1* (*very late factor-1*) está relacionado con una familia génica de integrasas y resolvasas presente en levaduras y procariotas. Finalmente, otros genes de baculovirus pueden tener su origen en procariotas como por ejemplo el gen de la quitinasa, *chiA*, que presenta una elevada similitud con un gen de

Serratia marcescens (AYRES *et al.*, 1994; HAWTIN *et al.*, 1995). Se desconoce cómo los baculovirus adquirieron genes de bacterias, pero una posible fuente podrían haber sido los simbiosis bacterianos intracelulares presentes en muchas especies de insectos (WERREN, 1997). Por tanto, es probable que los baculovirus hayan adquirido genes de diversos organismos a lo largo de su historia evolutiva.

4.2. Análisis filogenético de los baculovirus

Tradicionalmente, la clasificación de los baculovirus se ha realizado en función de su morfología y su nomenclatura se ha basado en el primer huésped del que fueron aislados. Gracias a la creciente disponibilidad de información molecular, recientemente se están realizando más esfuerzos para entender las relaciones filogenéticas y evolución de los baculovirus. Esta información podría utilizarse en el futuro para revisar la taxonomía de este grupo. El estudio de las relaciones filogenéticas de los baculovirus y sus huéspedes puede contribuir al mejor entendimiento de las adaptaciones biológicas tales como la especificidad de huésped, información necesaria para el uso de los baculovirus como biopesticidas. Los baculovirus se encuentran en varios órdenes de insectos, especialmente lepidópteros, y también en otros grupos de artrópodos, como los crustáceos marinos (COUCH, 1974). Este hecho hace suponer que la asociación entre los baculovirus y los invertebrados es antigua, posiblemente anterior a la colonización del medio terrestre por los artrópodos.

La mayoría de los análisis filogenéticos actuales incluyen principalmente baculovirus de lepidópteros y utilizan genes individuales tales como la *poliedrina/granulina* y la *dnapol* (ROHRMANN *et al.*, 1981; ZANOTTO *et al.*, 1993; BULACH *et al.*, 1999). Estos estudios corroboran la división de los baculovirus de lepidópteros en NPVs y GV. Los NPVs a su vez se dividen en dos grandes grupos. El grupo I incluye entre otros a AcMNPV, BmNPV, BmSNPV, OpMNPV y *Anticarsia gemmatilis* MNPV y el grupo II a OpSNPV, SeMNPV, *Helicoverpa zea* SNPV, *Mamestra brassicae* MNPV, *Spodoptera frugiperda* MNPV y probablemente LdMNPV (ZANOTTO *et al.*, 1993; COWAN *et al.*, 1994; BULACH *et al.*, 1999; LIU Y MARUNIAK, 1999). Cabe destacar que los tipos morfológicos SNPV (nucleopoliedrovirus simple) y MNPV (nucleopoliedrovirus múltiple) no constituyen grupos monofiléticos o clades (grupo que incluye todos los descendientes de un ancestro común). Los estudios filogenéticos indican que el clade que comprende los GV divergió antes de que los NPVs de lepidópteros se separasen en los grupos I y II (ZANOTTO *et al.*, 1993). Los granulovirus, al igual que los NPVs de lepidópteros, constituyen un grupo de virus genéticamente muy diverso.

La comparación de las filogenias de baculovirus con las de lepidópteros indica que la historia evolutiva de los baculovirus no está en concordancia con la organización taxonómica del orden Lepidoptera, por lo que se ha sugerido que algunos linajes de virus cambiaron de grupo de lepidópteros huéspedes posteriormente a la diversificación de los insectos (ZANOTTO *et al.*, 1993). La disponibilidad de secuen-

cias para un número más elevado de especies y el uso de más de un gen permitirá realizar análisis filogenéticos más robustos sobre la evolución de los baculovirus.

5. Agradecimientos

A S. Carranza por su ayuda y comentarios sobre el manuscrito.

6. Bibliografía

- AFONSO, C.L., E.R. TULMAN, Z. LU, E. OMA, G.F. KUTISH Y D.L. ROCK. 1999. *The genome of Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*. J. Virol. **73**:533-552.
- AHRENS, C.H., M.N. PEARSON Y G.F. ROHRMANN. 1995. *Identification and characterization of a second putative origin of DNA replication in a baculovirus of Orgyia pseudotsugata*. Virology **207**:572-576.
- AHRENS, C.H., R.L.Q. RUSSELL, C.J. FUNK, J.T. EVANS, S.H. HARWOOD Y G.F. ROHRMANN. 1997. *The sequence of the Orgyia pseudotsugata multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome*. Virology **229**:381-399.
- AYRES, M.D., S.C. HOWARD, J. KUZIO, M. LÓPEZ-FERBER Y R.D. POSSEE. 1994. *The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Virology **202**:586-605.
- BLISSARD, G.W., B. BLACK, N.E. CROOK, R. KEDDIE, R.D. POSSEE, G.F. ROHRMANN, D.A. THIELMANN Y L.E. VOLKMAN. 2000. *Family Baculoviridae*. En: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle y R.B. Wickner (ed.), *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York.
- BOORE, J.L. Y W.M. BROWN. 1998. *Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool*. Curr. Opin. Genet. Dev. **8**:668-674.
- BREINDL, V. Y O. JIROVEC. 1935. *Polyeder und Polyedervirus im Lichte der Feulgenschen Nucleareaktion*. Vest. Ceskoslov. Zool. Spol., Praha **3**:9.
- BROER, R., J.G.M. HELDENS, E.A. VAN STRIEN, D. ZUIDEMA Y J.M. VLAK. 1998. *Specificity of multiple homologous genomic regions in Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus DNA replication*. J. Gen. Virol. **79**:1563-1572.
- BULACH, D.M., C.A. KUMAR, A. ZAIA, B. LIANG Y D.E. TRIBE. 1999. *Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences*. J. Invertebr. Pathol. **73**:59-73.
- BURGESS, S. 1977. *Molecular weights of lepidopteran baculovirus DNAs: Derivation by electron microscopy*. J. Gen. Virol. **37**:501-510.
- CHEN, C.J. Y S.M. THIEM. 1997. *Differential infectivity of two Autographa californica nucleopolyhedrovirus mutants on three permissive cell lines is the result of lef-7 deletion*. Virology **227**:88-95.

- CHEN, X., Z. HU, J.A. JEHLE, Y. ZHANG Y J.M. VLAK. 1997. *Analysis of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of Heliothis armigera single-nucleocapsid baculovirus*. *Virus Genes* **15**:219-225.
- CHEN, X., W.F. IJIKEL, C. DOMINY, P.M. DE ANDRADE ZANOTTO, Y. HASHIMOTO, O. FAKTOR, T. HAYAKAWA, C. H. WANG, A. PREKUMAR, S. MATHAVAN, P.J. KRELL, Z. HU Y J.M. VLAK. 1999. *Identification, sequence analysis and phylogeny of the lef-2 gene of Helicoverpa armigera single-nucleocapsid baculovirus*. *Virus Res.* **65**:21-32.
- CHISHOLM, G.E. Y D.J. HENNER. 1988. *Multiple early transcripts and splicing of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene*. *J. Virol.* **62**:3193-3200.
- CHOI, J. Y L.A. GUARINO. 1995. *The baculovirus transactivator IE1 binds to viral enhancer elements in the absence of insect cell factors*. *J. Virol.* **69**:4548-4551.
- CLEM, R.J., J.M. HARDWICK Y L.K. MILLER. 1996. *Anti-apoptotic genes of baculoviruses*. *Cell Death Differ.* **3**:9-16.
- CLEM, R.J. 1997. *Regulation of programmed cell death by baculoviruses*, p. 237-266. *En*: L.K. Miller (ed.) *The baculoviruses*. Plenum Press, New York.
- COCHRAN, M Y P. FAULKNER. 1983. *Location of homologous DNA sequences interspersed at 5 regions in the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome*. *J. Virol.* **45**:961-970.
- COUCH, J. A. 1974. *Free and occluded virus similar to baculoviruses in hepatopancreas of pink shrimp*. *Nature* **247**:229-231.
- COWAN, P., D. BULACH, K. GOODGE, A. ROBERTSON Y D.E. TRIBE. 1994. *Nucleotide sequence of the polyhedrin gene region of Helicoverpa zea single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: placement of the virus in lepidopteran nuclear polyhedrosis virus group II*. *J. Gen. Virol.* **75**:3211-3218.
- CROOK, N. E., R.J. CLEM Y L.K. MILLER. 1993. *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. *J. Virol.* **67**:2168-2174.
- DERKSEN, A.C. Y R.R. GRANADOS. 1988. *Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity*. *Virology* **167**:242-250.
- DUCKETT, C.S., V.E. NAVA, R.W. GEDRICH, R.J. CLEM, J.L. VAN DONGEN, M.C. GILFILLAN, H. SHIELS, J.M. HARDWICK, C.B. THOMPSON. 1996. *A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors*. *EMBO J.* **15**:2685-2694.
- DURANTE, D., G. CROIZIER, M. RAVALLEC Y M. LÓPEZ-FERBER. 1998. *Temporal expression of the AcMNPV lef-4 gene and subcellular localization of the protein*. *Virology* **241**:276-284.
- ELDRIDGE, R., Y. LI Y L.K. MILLER. 1992. *Characterization of a baculovirus gene encoding a small conotoxin-like polypeptide*. *J. Virol.* **66**:6563-6571.
- ELLEDGE, S.J., Z. ZHOU Y J.B. ALLEN. 1992. *Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation*. *Trends Biochem. Sci.* **17**:119-123.
- FRIESEN, P.D. 1993. *Invertebrate transposable elements in the baculovirus genomes: characterization and significance*, p. 147-178. *En*: N.E. Beckage, S.N. Thompson y B.A. Federici (ed.), *Parasites and pathogens of insects: parasites*, vol. 2. Academic Press, London.

- FUNK, C.J., S.C. BRAUNAGEL Y G.F. ROHRMANN. 1997. *Baculovirus structure*, p. 7-32. En: L.K. Miller (ed.), *The baculoviruses*. Plenum Press, New York.
- GARCIA-MARUNIAK, A., O.H.O. PAVAN Y J.E. MARUNIAK. 1996. *A variable region of Anticarsia gemmatilis nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences*. *Virus Res.* **41**:123-132.
- GOMI, S., K. MAJIMA Y S. MAEDA. 1999. *Sequence analysis of the genome of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. *J. Gen. Virol.* **80**:1323-1337.
- GRIFFITHS, C.M., A.L. BARNETT, M.D. AYRES, J. WINDASS, L.A. KING Y R.D. POSSEE. 1999. *In vitro host range of Autographa californica nucleopolyhedrovirus recombinants lacking functional p35, iap1 or iap2*. *J. Gen. Virol.* **80**:1055-1066.
- GUARINO, L.A., G. SMITH Y W. DONG. 1995. *Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor*. *Cell* **80**:301-309.
- HAAS, A.L., D.J. KATZUNG, P.M. REBACK Y L.M. GUARINO. 1996. *Functional characterization of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus Autographa californica*. *Biochem.* **35**:5385-5394.
- HASHIMOTO, Y., B.G. CORSARO Y R.R. GRANADOS. 1991. *Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the Trichoplusia ni granulosis virus*. *J. Gen. Virol.* **72**:2645-2651.
- HAWTIN, R.E., ARNOLD, K., AYRES, M.D., ZANOTTO, P.M.D.A., HOWARD, S.C., GOODAY, G.W., CHAPPELL, L.H., KITTS, P.A., KING, L.A. Y R.D. POSSEE. 1995. *Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome*. *Virology* **212**:673-685.
- HAWTIN, R.E., T. ZARKOWSKA, K. ARNOLD, C.J. THOMAS, G.W. GOODAY, L.A. KING, J.A. KUZIO Y R.D. POSSEE. 1997. *Liquefaction of Autographa californica nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes*. *Virology* **238**:243-253.
- HAY, B.A., T. WOLFF Y G.M. RUBIN. 1994. *Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila*. *Development* **120**:2121-2129.
- HAY, B.A., D.A. WASSARMAN Y G.M. RUBIN. 1995. *Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death*. *Cell* **83**:1253-1262.
- HAYAKAWA, T., R. KO, K. OKANO, S. SEONG, C. GOTO Y S. MAEDA. 1999. *Sequence analysis of the Xestia c-nigrum granulovirus genome*. *Virology* **262**:277-297.
- HOCHSTRASSER, M. 1996. *Protein degradation or regulation: Ub the judge*. *Cell* **84**:813-815.
- HOOF VAN IDEKINGE, B.J.L., G.E. SMITH Y M.D. SUMMERS. 1983. *Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *Virology* **131**:561-565.
- HU, Z.H., R. BROER, J. WESTERLAKEN, J.W. MARTENS, F. JIN, J.A. JEHL, L.M. WANG Y J.M. VLAK. 1997. *Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of Buzura suppressaria*. *Virus Res.* **47**:91-97.
- IJKEL, W.F.J., E.A. VAN STRIEN, J.G.M. HELDENS, R. BROER, D. ZUIDEMA, R.W. GOLDBACH Y J.M. VLAK. 1999. *Sequence and organization of the Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus genome*. *J. Gen. Virol.* **80**:3289-3304.

- JEHLE, J.A., NICKEL, A., VLAK, J.M. Y H. BACKHAUS. 1998. *Horizontal escape of the novel Tc1-like lepidopteran transposon TCp3.2 into Cydia pomonella granulovirus*. J. Mol. Evol. **46**:215-224.
- KANG, W., M. SUZUKI, E. ZEMSKOV, K. OKANO Y S. MAEDA. 1999. *Characterization of baculovirus repeated open reading frames (bro) in Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. J. Virol. **73**:10339-10345.
- KOOL, M., C.H. AHRENS, J.M. VLAK Y G.F. ROHRMANN. 1995. *Replication of baculovirus DNA*. J. Gen. Virol. **76**:2103-2118.
- KOVACS, G.R., L.A. GUARINO, B.L. GRAHAM Y M.D. SUMMERS. 1991. *Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection*. Virology **185**:633-643.
- KUZIO, J., M.N. PEARSON, S.H. HARWOOD, C.J. FUNK, J.T. EVANS, J.M. SLAVICEK Y G.F. ROHRMANN. 1999. *Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for Lymantria dispar*. Virology **253**:17-34.
- LEE, H.H. Y L.K. MILLER. 1978. *Isolation of genotypic variants of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **27**:754-767.
- LEISY, D.J., C. RASMUSSEN, H.T. KIM Y G.F. ROHRMANN. 1995. *The Autographa californica nuclear polyhedrosis virus homologous region 1a: identical sequences are essential for DNA replication activity and transcriptional enhancer function*. Virology **208**:742-752.
- LIU, J.C. Y J.E. MARUNIAK. 1999. *Molecular characterization of genes in the GP41 region of baculoviruses and phylogenetic analysis based upon GP41 and polyhedrin genes*. Virus Res. **64**:187-196.
- MONSMA, S.A., A.G.P. OOMENS Y G.W. BLISSARD. 1996. *The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection*. J. Virol. **70**:4607-4616.
- MORSE, M.A., A.C. MARRIOTT Y P.A. NUTTALL. 1992. *The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64*. Virology **186**:640-646.
- MUÑOZ, D., R. MURILLO, P.J. KRELL, J.M. VLAK Y P. CABALLERO. 1999. *Four genotypic variants of a Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region*. Virus Res. **59**:61-74.
- O'BRIEN, S., M. MENOTTI-RAYMOND, W.J. MURPHY, W.G. NASH, J. WIENBERG, R. STANYON, N.G. COPELAND, N.A. JENKINS, J.E. WOMACK Y J.A. MARSHALL GRAVES. 1999. *The promise of comparative genomics in mammals*. Science **286**:458-481.
- OLIVERA, B.M., G.P. MILJANICH, J. RAMACHANDRAN Y M.E. ADAMS. 1994. *Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The omega-conotoxins and omega-agatoxins*. Annu. Rev. Biochem. **63**:823-867.
- OOL, B.G. Y L.K. MILLER. 1990. *Transcription of the baculovirus polyhedrin gene reduces the levels of an antisense transcript initiated downstream*. J. Virol. **64**:3126-3129.
- O'REILLY, D.R., L.K. MILLER Y V.A. LUCKOW. 1994. *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- O'REILLY, D.R. 1997. *Auxiliary genes of baculoviruses*, p. 267-300. En: L.K. Miller (ed.) The baculoviruses. Plenum Press, New York.
- PASSARELLI, A.L. Y L.K. MILLER. 1993. *Identification of genes encoding late expres-*

- sion factors located between 56.0 and 65.4 map units of the *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* genome. *Virology* **197**:704-714.
- PASSARELLI, A.L. Y L.K. MILLER. 1994. Identification and transcriptional regulation of the baculovirus *lef-6* gene. *J. Virol.* **68**:4458-4467.
- PEARSON, M.N., R.M. BJORNSON, G.D. PEARSON Y G.F. ROHRMANN. 1992. The *Autographa californica baculovirus* genome: Evidence for multiple replication origins. *Science* **257**:1382-1384.
- PEARSON, M.N. Y G.F. ROHRMANN. 1995. *Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus* homologous regions: Characterization of their ability to function as replication origins. *J. Virol.* **69**:213-221.
- PEARSON, M.N. Y G.F. ROHRMANN. 1997. Splicing is required for transactivation by the immediate early gene 1 of the *Lymantria dispar* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **235**:153-165.
- PEARSON, M.N. Y G.F. ROHRMANN. 1998. Characterization of a baculovirus encoded ATP-dependent DNA ligase. *J. Virol.* **72**:9142-9149.
- POSSEE, R.D. Y G.F. ROHRMANN. 1997. Genome organization and evolution, p. 109-140. En: L.K. Miller (ed.) *The baculoviruses*. Plenum Press, New York.
- RODEMS, S.M. Y P.D. FRIESEN. 1995. Transcriptional enhancer activity of *hr5* requires dual-palindrome half sites that mediate binding of a dimeric form of the baculovirus transregulator *IE1*. *J. Virol.* **69**:5368-5375.
- ROELVINK, P.W., B.G. CORSARO Y R.R. GRANADOS. 1995. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancer genes. *J. Gen. Virol.* **76**:2693-2705.
- ROHRMANN G.F., J.W. CARNEGIE, M.E. MARTIGNONI Y G.S. BEAUDREAU. 1977. Characterization of the genome of the nucleopolyhedrosis bundle virus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *Virology* **80**:421-425.
- ROHRMANN, G.F., M.N. PEARSON, T.J. BAILEY, R.R. BECKER Y G.S. BEAUDREAU. 1981. N-Terminal polyhedrin sequences and occluded baculovirus evolution. *J. Mol. Evol.* **17**:329-333.
- ROTHER, M., M.G. PAN, W.J. HENZEL, T.M. AYRES Y D.V. GOEDDEL. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**:1243-1252.
- SMITH, G.E. Y M.D. SUMMERS. 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* **89**:517-527.
- SUGIMOTO, A., P.D. FRIESEN Y J.H. ROTHMAN. 1994. Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a *ced-9* mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **13**:2023-2028.
- SUMMERS, M. Y D. ANDERSON. 1972. Granulosis virus deoxyribonucleic acid: A closed double-stranded molecule. *J. Virol.* **9**:710-713.
- THOMPSON, M.J., M.F. FELDLAUER, R. LOZANO, H.H. REES, W.R. LUSBY, J.A. SVOBODA Y K.R. WILZER. 1987. Metabolism of 26-14C hydroxyecdysone 22-glucoside. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **4**:1-15.
- TOMALSKI, M.D., R. ELDRIDGE Y L.K. MILLER. 1991. A baculovirus homolog of a Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Virology* **184**:149-161.

- VAN OERS, M.M. Y J.M. VLAK. 1997. *The baculovirus 10-kDa protein*. J. Invertebr. Pathol. **70**:1-17.
- VIALARD, J.E., L. YUEN Y C.D. RICHARDSON. 1990. *Identification and characterization of a baculovirus occlusion body glycoprotein which resembles spheroidin, an entomopoxvirus protein*. J. Virol. **64**:5804-5811.
- VIALARD, J.E. Y C.D. RICHARDSON. 1993. *The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein*. J. Virol. **67**:5859-5866.
- VLAK, J.M. Y G.E. SMITH. 1982. *Orientation of the genome of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: A proposal*. J. Virol. **41**:1118-1121.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1998. *Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval Trichoplusia ni and its role in limiting baculovirus infection*. J. Invert. Pathol. **72**:57-62.
- WEITZMAN M.D., R.D. POSSEE Y L.A. KING. 1992. *Characterization of two variants of Panolis flammea multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus*. J. Gen. Viol. **73**:1881-1886.
- WERREN, J.H. 1997. *Biology of Wolbachia*. Annu. Rev. Entomol. **42**:587-609.
- XIE, W.D., B. ARIF, P. DOBOS Y P.J. KRELL. 1995. *Identification and analysis of a putative origin of DNA replication in the Choristoneura fumiferana multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome*. Virology **209**:409-419.
- ZANOTTO, P.M. DE A., B.D. KESSING Y J.E. MARUNIAK. 1993. *Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations*. J. Invertebr. Pathol. **62**:147-164.