



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 28

Identificação do gene *dnapol* de *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus

Caren Cristina Dalmolin
Ana Cláudia Batista dos Santos
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Bergmann Morais Ribeiro
Marlinda Lobo de Souza
Maria Elita Batista de Castro

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
 Marcos Rodrigues de Faria
 Marta Aguiar Sabo Mendes
 Sueli Correa Marques de Mello
 Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Edson Junqueira Leite
 José Roberto de Alencar Moreira
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva
Edição eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Identificação do gene *dnapol* de *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus / Caren Cristina Dalmolin... [et al.]. - - Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 14 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; n. 28).
1. *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. 2. Baculovírus. 3. Replicação de DNA viral. 4. Vírus de inseto. I. Dalmolin, Caren Cristina. II. Série.

579.2 CDD 21

© Embrapa 2002

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Materiais e Métodos	9
Vírus	9
Sonda de oligonucleotídeos	9
Hidridizações Southern Blot e marcação radioativa de DNA	9
Resultados e Discussão	10
Referências Bibliográficas	13

Identificação do gene *dnapol* de *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus

*Caren Cristina Dalmolin*¹

*Ana Cláudia Batista dos Santos*²

*Zilda Maria de Araújo Ribeiro*³

*Bergmann Morais Ribeiro*⁴

*Marlinda Lobo de Souza*⁵

*Maria Elita Batista de Castro*⁵

Resumo

O *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) tem sido amplamente empregado como um bioinseticida para controle de *A. gemmatalis*, a principal praga da cultura da soja no Brasil. Contudo, pouco se conhece sobre a estrutura e replicação de seu genoma. A proteína DNA polimerase exerce um importante papel na determinação tanto em nível de replicação como de especificidade ao hospedeiro. Para maior conhecimento sobre a replicação do genoma, o gene da DNA polimerase (*dnapol*) de AgMNPV foi identificado, localizado, e parcialmente sequenciado. A localização desse gene foi determinada por PCR, utilizando-se de primers sintetizados a partir de regiões conservadas de genes *dnapol* de diferentes baculovirus, e de hibridização de fragmentos de restrição de DNA de AgMNPV com uma sonda previamente preparada do gene DNA polimerase de *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (Southern-blot). Um fragmento do genoma AgMNPV (*HindIII-Q*), correspondente ao gene putativo da DNA polimerase, foi amplificado por PCR. Para confirmação da localização do gene da DNA polimerase, as extremidades desse fragmento obtido de uma biblioteca genômica de AgMNPV foram sequenciadas em ambas direções. A região de 1,4 kb sequenciada foi analisada pelo programa BLAST NCBI, blastx, revelando

¹ Bióloga, B.Sc, Universidade de Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Estagiária - Centro Universitário de Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga, M.Sc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Biólogo, PhD, Universidade de Brasília.

⁵ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

alta homologia com o gene DNA polimerase de *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus (OpMNPV) e *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus (CfMNPV). Atualmente, os fragmentos *Hind*III-R e -S de AgMNPV e outras regiões de sobreposição estão sendo sequenciadas. Estudos para determinar a sequência completa e análise transcricional do gene *dnapol* de AgMNPV estão em andamento.

Identification of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus DNA polymerase gene

Abstract

The *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) has been widely employed as a bioinsecticide for the control of the velvetbean caterpillar *A. gemmatalis*, the major soybean pest in Brazil. However, very little is known about its genome structure and replication. The DNA polymerase protein plays an important role in determining both the level of genomic replication and host specificity of DNA viruses. In order to understand more about the AgMNPV genome replication, the DNA polymerase gene (*dnapol*) of AgMNPV was identified, located, and partially sequenced. The location of this gene was determined by PCR, using primers made from conserved regions of *dnapol* genes from different baculoviruses and Southern-blot hybridization using AgMNPV DNA restriction fragments and a probe prepared from the previously identified polymerase gene from the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV). We have amplified, by PCR, a DNA fragment from the AgMNPV genome (*Hind*III-Q fragment), corresponding to the putative DNA polymerase gene. To more precisely locate the DNA polymerase gene, the ends of the *Hind*III-Q fragment from an AgMNPV genomic library were sequenced in both directions. An 1.4 kbp region was sequenced and computer analyzed, revealing a high homology to *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus (OpMNPV) and *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus (CfMNPV) DNA polymerase genes. Presently, the AgMNPV fragments *Hind*III-R and -S, and additional overlapping regions are being sequenced. Studies are in progress to determine the complete sequence and transcriptional analysis of AgMNPV *dnapol* gene.

Introdução

Baculoviridae é uma importante família de vírus que infecta a maioria de espécies de insetos, principalmente Lepidoptera produzindo uma infecção sistêmica em seus hospedeiros. *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) é um membro dessa família e devido seu potencial de infecção tem sido amplamente empregado como bioinseticida para o controle da lagarta *A. gemmatalis*, principal praga da soja no Brasil.

Os baculovirus possuem um complexo ciclo de replicação, e atualmente muito pouco é conhecido sobre a estrutura genômica e replicação da maioria desses vírus, constando deste grupo o vírus AgMNPV.

O ciclo de infecção dos baculovirus culmina na produção, em altos níveis, de duas progênes infecciosas morfologicamente e temporalmente distintas, a forma BV ("budded virus") e a OV ("occluded virus"). A multiplicação viral, e portanto a síntese dessas formas infecciosas, está dividida, por definição, em diferentes fases temporais de expressão gênica: a fase "early", que ocorre antes da replicação de DNA e a fase "late", que ocorre no início ou após a replicação, e que está subdividida em "very late". Estas três fases de expressão gênica correspondem biologicamente à reprogramação da célula para replicação viral, produção de BV e produção de OV. Estudos demonstrando esses eventos de replicação viral têm sido predominantemente conduzidos em *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) e *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus (OpMNPV) (Lu et al., 1997, para revisão). Entre os vários genes envolvidos no processo de replicação do DNA viral, o gene *dnapol* foi inicialmente identificado em AcMNPV como um gene "early", que codifica um polipeptídeo de 114,3 kDa e possui homologia com DNA polimerases de outros baculovirus (Tomalski et al., 1988; Earl et al., 1986; Larder et al., 1987).

Neste trabalho são apresentados resultados sobre a identificação e localização do gene da DNA polimerase (*dnapol*) no genoma de AgMNPV. O sequenciamento deste gene e sua caracterização são importantes, uma vez que a proteína DNA polimerase exerce um papel determinante na replicação genômica e especificidade do hospedeiro. Além disso, estudos posteriores sobre expressão e análise funcional poderão fornecer subsídios para elucidação do processo de replicação e para o melhoramento da eficiência do AgMNPV como um bioinseticida.

Materiais e Métodos

Vírus

O clone viral utilizado, AgMNPV-2D, fornecido pelo Dr. James Maruniak, Universidade da Florida – E.U.A., foi obtido por purificação em “plaque assay” a partir do isolado tipo selvagem AgMNPV. Em hibridizações Southern-blot, o vírus AcMNPV (fornecido pelo Dr. L. K. Miller, Universidade de Georgia, E.U.A) foi utilizado como controle positivo, e seu DNA foi também usado como molde para amplificação por PCR.

Sonda de oligonucleotídeos

Primers foram sintetizados baseados em sequência publicada do gene *dnapol* (Tomalski et al., 1988). Os primers pol-291 e pol+290 II foram desenhados com auxílio do Programa GCG Package da Universidade de Wisconsin (EUA). Esses primers são degenerados e foram feitos a partir de regiões conservadas dos genes *dnapol* de diferentes baculovirus. Os primers correspondem a regiões de -291 a -271 e +260 a +290 dentro do códon de iniciação de tradução do gene *dnapol* de AcMNPV. Esses primers foram utilizados para amplificar, por PCR, DNA purificado de AcMNPV (20ng). O produto amplificado por PCR, um fragmento de 581pb, foi então usado como sonda em hibridizações Southern-blot.

Hibridizações Southern Blot e marcação radioativa de DNA

DNA genômico de AgMNPV (2µg) foi digerido com quatro endonucleases de restrição, *BstEII*, *EcoRI*, *HindIII* and *PstI*, e submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%, e em seguida transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N+) de acordo com instruções do fabricante (Amersham). A membrana (“blotted membrane”) foi hibridizada com a sonda gerada por amplificação via PCR descrita acima. A sonda de DNA foi marcada com [³²P]dCTP (Random Prime Labelling System) seguindo o protocolo recomendado pelo fornecedor (Amersham Pharmacia). A hibridização ocorreu a 68°C por 16 horas, e então a membrana (“blot”) foi lavada sob condições previamente descritas por O’Reilly et al. (1992), e exposta a um filme raio-X (Kodak AR-5X-Omat) a -80°C.

Resultados e Discussão

A localização do gene *dnapol* de AgMNPV foi determinada por análise de hibridizações Southern blotting usando uma sonda preparada a partir do gene *dnapol* AcMNPV, produto amplificado por PCR com 581bp (Fig. 1), contra o DNA genômico de AgMNPV digerido com as enzimas *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I (Fig. 2). A sonda hibridizou em fragmentos únicos de restrição de DNA de AgMNPV. Os fragmentos hibridizados foram *Bst*EII B, *Eco*RI B, *Hind*III-Q e *Pst*I C (Fig. 3, 2-5). Todos esses fragmentos sobrepõem uma região comum no mapa físico de restrição previamente estabelecido para o genoma de AgMNPV (Johnson & Maruniak, 1989). Como esperado, um sinal intenso de hibridização foi observado com o DNA do próprio AcMNPV, que serviu como molde para o preparo da sonda (Fig 3, 1).

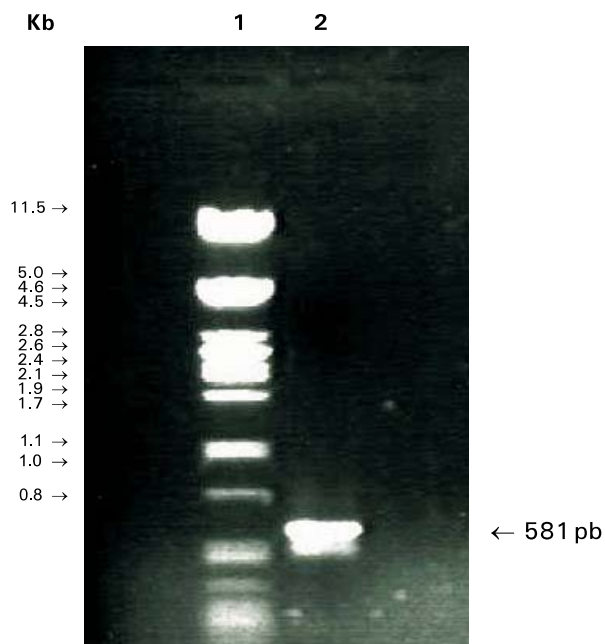


Fig. 1. Produto amplificado por PCR a partir do DNA de AcMNPV. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Marcador molecular DNA λ /*Pst*I (1), fragmento de 581pb (2).

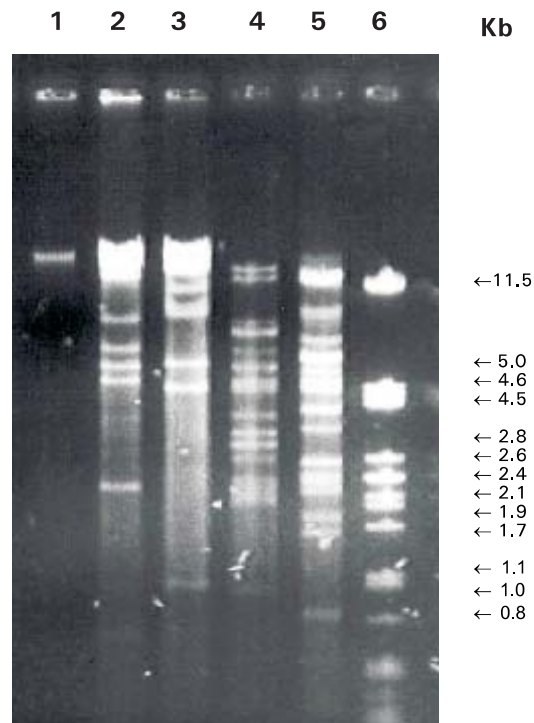


Fig. 2. Análise de restrição de DNA. Eletroforese em gel de agarose (0,8%). DNA de AcMNPV (1), DNA de AgMNPV digerido com *BstEII*, *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*, respectivamente (2-5), marcador molecular DNA $\lambda/PstI$ (6).

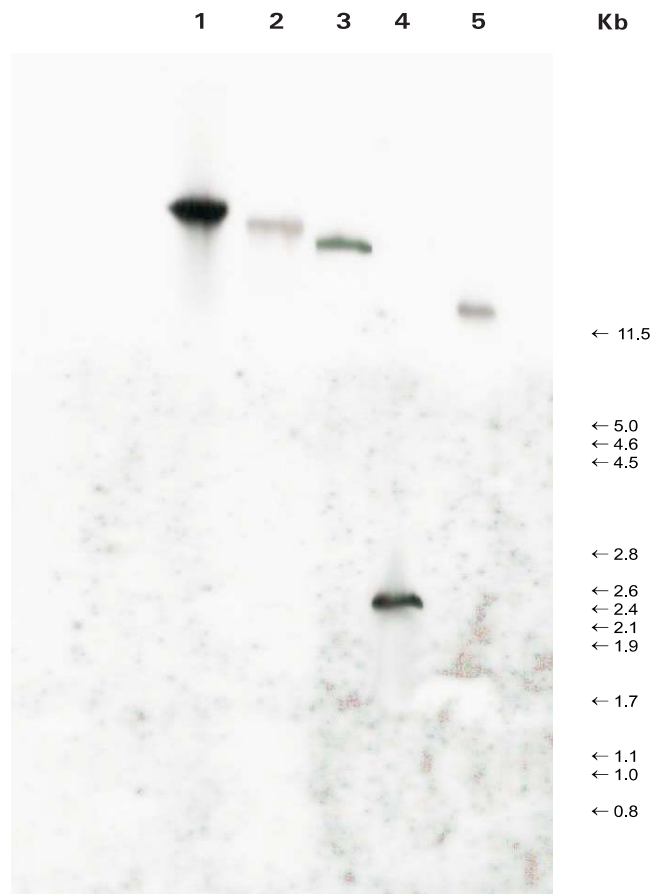


Fig. 3. Hibridização Southern blotting do DNA de AgMNPV. O produto de 581 pb produzido por PCR foi utilizado como sonda. DNA de AcMNPV (1), fragmentos de restrição de AgMNPV hibridizados com a sonda: *Bst*EII B, *Eco*RI B, *Hind*III Q e *Pst*I B (2-5). O marcador molecular está indicado à direita do "blot".

Para precisamente identificar o gene *dnapol* AgMNPV, as extremidades do fragmento *Hind*III-Q de uma biblioteca genômica de AgMNPV/*Hind*III (fornecida por Dr. J. Maruniak, Universidade da Florida) foram inicialmente sequenciadas em ambas direções. A análise computacional mostrou que a sequência obtida

indica uma região do genoma que corresponde ao gene putativo da DNA polimerase (Fig. 4). Esta região revela uma alta homologia aos genes da DNA polimerase de *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus (OpMNPV) com 83% de identidade e *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus (CfMNPV) com 81% de identidade. Atualmente, dois fragmentos, S e R, da biblioteca genômica de AgMNPV/*HindIII*, e adicionais regiões de sobreposição estão sendo sequenciados. Estudos estão sendo desenvolvidos para determinar a sequência completa e análise transcricional do gene *dnapol* de AgMNPV.

Fig. 4. Resultados Parciais do BlastX de um fragmento de 800 pb obtido de uma das extremidades do fragmento *HindIII*-Q de AgMNPV

```
>gi|9630008|ref|NP_046226.1| (NC_001875) DNA polymerase [Orgyia pseudotsugata single
capsid
      nuclear polyhedrosis virus]
gi|2494189|sp|Q83948|DPOL_NPVOV DNA polymerase
gi|7434805|pir||T10339 DNA polymerase - Orgyia pseudotsugata nuclear polyhedrosis
virus
gi|1063688|gb|AAB04046.1| (U39145) DNA polymerase [Orgyia pseudotsugata single
capsid nuclear
      polyhedrosis virus]
gi|1911316|gb|AAC59069.1| (U75930) DNA polymerase [Orgyia pseudotsugata single
capsid nuclear
      polyhedrosis virus]
      Length = 985

Score = 265 bits (676), Expect = 6e-70
Identities = 139/220 (63%), Positives = 157/220 (71%), Gaps = 3/220 (1%)
Frame = -3

Query: 734 ETD MIX-FFWIF*XL*PPTDFDYHGDVFDXRXIRAGLNGNNQRCAATICPLCQSQHPSCL 558
      E MI FF + P DY+GDVFD IR L G+ P Q +
Sbjct: 254 ENHMITAFFEFLKTVNPDVILDYNGDVFDLPYIRGRLLKGDKPLRRYDL PAMQPNTKLF I 313

Query: 557 SPRLVXKTDITYYFNYYIHIDLYKYFGVDANNRDVENFQLNLTLSKY YLGD AKVDLDWQIMV 378
      + ++ +TDTYYFNYYIHIDLYKYFGVDAN RDVENFQLNLTLS+YYLGD AKVDL+WQIMV
Sbjct: 314 T-KIGNRTDITYYFNYYIHIDLYKYFGVDANKRDVENFQLNLTLSQYYLGD AKVDLNNWQIMV 372

Query: 377 RMYNNKQLGTIIIEYNVQDCXXXXXXXXXXXXLNDFMYSQCLMYRLCTDDDFICNISHLISTT 198
      MYNNKQLGTII+YNVQDC L DFMYSQC+MYRLCTDDDFICNISHLIS+T
Sbjct: 373 EMYNNKQLGTIIKYNVQDCLLPIRLFNKLLKLTDFMYSQCIMYRLCTDDDFICNISHLISST 432

Query: 197 FFHLALINTRINPSTGLDKPDLYFFDKNXLX LMS-GNAG 84
      FFHLALINTR +P+TGL D YFF+K+ L LMS G+AG
Sbjct: 433 FFHLALINTRADPATGLITVSDPYFFNKDDLGLMSSKGSAG 472
```

```

>gi|15320715|ref|NP_203227.1| (NC_003083) DNAPOL [Epiphyas postvittana
nucleopolyhedrovirus]
gi|15213183|gb|AAK85622.1| (AY043265) DNAPOL [Epiphyas postvittana
nucleopolyhedrovirus]
Length = 960

Score = 262 bits (670), Expect = 3e-69
Identities = 135/218 (61%), Positives = 153/218 (69%), Gaps = 1/218 (0%)
Frame = -3

Query: 734 ETDMLXFFWIF*XL*-PPTDFDYHGDVFDXRXIRAGLNGNNQRCAATICPLCQSQHPSCLE 558
      ETDMI F+ F + P DY+GDVFD IR+ L G P C +
Sbjct: 255 ETDMLVAFDFLKIIVNPDVILDYNGDVFDLPYIRSRLKGGKIMLQRYDLP-CMPNPNTKLF 313

Query: 557 SPRLVXKTDITYYFNYYIHIDLYKYFGVDANNRDVENFQNLNTLSKYYLGDQKVDLDWQTMV 378
      ++ +TDITYYFNYYIHIDLYKYFG DAN RDVENFQNLNTLSKYYLGD KVDL+WQ MV
Sbjct: 314 ITKIGNRTDITYYFNYYIHIDLYKYFGADANKRDVENFQNLNTLSKYYLGDTKVDLWQDMV 373

Query: 377 RMYNNKQLGTIIIEYNVQDCXXXXXXXXXXXXLNDFMYSQCLMYRLCTDDFCINISHLISST 198
      +MYN+KQL TII+YNVQDC LNDFMYSQC+MYRLCTDDFCINISHLIS+T
Sbjct: 374 KMYNSKQLETIIKYNVQDCLLPIRLFLKLLKLNDFMYSQCIMYRLCTDDFCINISHLISST 433

Query: 197 FFHLALTNIRTNPSTGLDKPDLYFFDKNXLXLMGNGAG 84
      FFHLALTNTR NP+T ++ D YFF+KN L MS G
Sbjct: 434 FFHLALTNTRANPTTESNERDAYFFNKNDLGFMSCKNG 471

```

Referências Bibliográficas

- EARL, P.L.; JONES, E.V.; MOSS, B. Homology between DNA polymerase of poxviruses, herpesviruses and adenoviruses. Nucleotide sequence of *Vaccinia virus* DNA polymerase gene. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, DC, v. 83, p. 3659-3663, 1986.
- JOHNSON, D. W.; MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. *Journal of General Virology*, Reading, v. 70, p. 1877-1883, 1989.
- LARDER, B. A.; KEMP, S. D.; DARBY, G. (1987). Related functional domain in virus DNA polymerases. *EMBO Journal*, Oxford, UK, v. 6, p. 169-175, 1987.
- LU, A.; KRELL, P.J.; VLAK, J.M.; ROHRMANN, G. F. Baculoviruses DNA replication. In: Miller, L.K. *The Baculoviruses*. New York: Plenum Press. 1997, p.171-191.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. W. H. Salt Lake City: Freeman, 1992. p. 1-347.
- TOMALSKI, M. D.; WU, J.; MILLER, L. K. (1988). The location, sequence, transcription and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology*, San Diego, v. 167, p. 591- 600, 1988.