

**Caracterização do gene 25K FP de
Anticarsia gemmatalis
nucleopolyhedrovirus**



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Dietrich Gerhard Quast
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiro
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro
Chefe -Geral

Cla de Oliveira Goedert
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

Arthur da Silva Mariante
Chefe-Adjunto de Administração

**Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 44**

**Caracterização do gene *25K FP* de
Anticarsia *gemmatalis*
nucleopolyhedrovirus**

Marlinda Lobo de Souza
Maria Elita Batista de Castro
William Sihler
Caren Cristina Dalmolin
Márcia Regina da Silva Pedrini
Felipe Rodrigues da Silva

Brasília, DF
2003

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: Maria José de Oliveira Duarte
Membros: Maurício Machaim Franco
 Regina Maria Dechechi G. Carneiro
 Maria Alice Bianchi
 Sueli Correa Marques de Mello
 Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Arthur da Silva Mariante
 Maria Fátima Batista
Supervisor Editorial: Maria José de Oliveira Duarte
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de Ilustrações: Altevir de Carvalho Freitas
Editoração Eletrônica: Altevir de Carvalho Freitas

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 150

Todos os direitos reservados.

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

Caracterização do gene 25k FP de *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus /
Marlinda Lobo de Souza ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia, 2003.
16 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 44)

1. Bioinseticida. 2. Baculovirus. I. Souza, Marlinda Lobo de. II. Série.

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	11
Referências Bibliográficas	13

Caracterização do gene *25K FP* de *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus

Marlinda Lobo de Souza¹
Maria Elita Batista de Castro¹
William Sihler²
Caren Cristina Dalmolin³
Márcia Regina da Silva Pedrini⁴
Felipe Rodrigues da Silva⁵

Resumo

A produção de baculovirus *in vitro* para uso como bioinseticida constitui um forte requerimento sob a perspectiva comercial. Entretanto, a acumulação de variações genotípicas por passagem seriada em cultura de células apresenta-se como um fator limitante. Um dos efeitos mais importantes da passagem viral é a alteração do fenótipo parental, com muitos poliedros por célula (MP), para o fenótipo com poucos poliedros por célula (FP). O principal problema do efeito de passagem seriada do vírus está na redução do processo de oclusão e na perda da virulência dos vírus oclusos (PIB). Mutações freqüentes têm sido identificadas dentro de uma região específica em mutantes FP, contendo o *locus* do gene *25K FP*. Este gene codifica uma proteína de 25 kDa, essencial para a oclusão do vírion e formação dos poliedros. No Brasil, *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) tem sido utilizado com sucesso para o controle biológico da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. Atualmente, a produção viral é feita *in vivo* através da infecção de lagartas em campo. Neste trabalho, foi identificado e seqüenciado o gene *25K FP* de AgMNPV 2D, um isolado viral purificado por "plaque assay". A localização foi feita utilizando-se a técnica *Southern Blotting*, na qual os fragmentos de restrição do DNA de AgMNPV foram separados por eletroforese e hibridizados com a sonda do gene *25K FP* de *Helicoverpa armigera* SNPV. Sinais de hibridização foram identificados nos fragmentos de AgMNPV *HindIII*-R e *HindIII*-S (co-migração em gel), *EcoRI*-B, *BstEI*-B e *PstI*-A. A seqüência nucleotídica completa foi obtida pelo método "dye terminator chemistry" após subclonagem dos fragmentos de uma biblioteca genômica *HindIII* do vírus. A ORF ("open reading frame") do gene *25K FP* de AgMNPV possui 627 pb, codificando 208 aminoácidos. O gene apresenta 97 pb localizados no fragmento *HindIII*-S (N-terminal) e 530 pb no fragmento *HindIII*-R (C-terminal). Os valores de identidade obtidos pelo alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína *25K FP* de AgMNPV com a de outros baculovirus indicaram maior proximidade com *Epiphyas postvittana* MNPV (83%), *Orgyia pseudotsugata* MNPV (79%) e com *Choristoneura fumiferana* MNPV (76%). Finalmente, uma árvore filogenética foi reconstruída com base no gene *25K FP* de diversos baculovirus.

¹Bióloga, PhD, Virologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Biólogo, MSc, Biologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³Bióloga, BSc, Mestranda Universidade de Brasília e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴Engenheira de alimentos, PhD, Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

⁵Biólogo, PhD, Biotecnologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Characterization of the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus 25K FP gene

Abstract

The *in vitro* production of several baculoviruses is still a strong requirement on a commercial perspective of their use as insecticides. However the accumulation of genotypic variations by serial passage in cell culture is a strong limitation. One of the most important effects of the viral passage is the change from the parental, many polyhedra per cell (MP) phenotype to the few polyhedra per cell (FP) phenotype. The major problem of the passage effect is the reduced occlusion production and loss of virulence of the occluded virus (PIB). Frequent mutations have been identified within a specific region in the FP mutants that contains the 25K FP locus. This gene encodes a 25 kDa protein that is essential for virion occlusion and polyhedron formation. In Brazil the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) has been extensively applied on soybean crops to control the velvetbean caterpillar. Production of the virus is currently done by *in vivo* infection of caterpillars on the field. In this work the 25 K FP gene of the AgMNPV 2D, a plaque purified virus, was identified and sequenced. Localization was done by *Southern Blotting* in which electrophoretically separated AgMNPV DNA restriction fragments were probed with the 25K FP gene of *Helicoverpa armigera* SNPV. Signals of hybridization were produced for *Hind*III-R/ *Hind*III-S (comigrated in the gel), *Eco*RI-B, *Bst*EI-B and *Pst*I-A fragments of AgMNPV. The complete nucleotide sequence was performed by dye terminator chemistry method after subcloning fragments of a viral *Hind*III library. The 25K FP gene opening reading frame of AgMNPV is 627 bp, encoding for 208 amino acids. It was found that 94 bp of the gene is located in the *Hind*III-S fragment (N-terminal) and 530 bp in the *Hind*III-R fragment (C-terminal). The values of identity, concerning the AgMNPV, obtained by amino acid sequence alignment of 25K FP protein from other baculoviruses were more close related to *Epiphyas postvittana* MNPV (83%), *Orgyia pseudotsugata* MNPV (79%) and *Choristoneura fumiferana* MNPV (76%). Finally, a phylogenetic tree was reconstructed based on the 25K FP gene of several baculoviruses.

Comentário: Não foi usando o BigDye?

Introdução

A passagem seriada de baculovirus em cultura de células de insetos pode resultar em uma variedade de mutações e em populações virais defectivas. Esse evento é também conhecido como o efeito passagem. As mutações mais comuns são: Mutantes FP (“Few Plaque mutants”) e Partículas Interferentes Defectivas (DIPs).

Uma das primeiras variações a serem descritas a nível genético, decorrentes da passagem seriada de baculovirus (NPVs), foi a mudança do fenótipo parental “muitos poliedros” por célula (MP) para o fenótipo “poucos poliedros” (FP). Esses mutantes já foram descritos para os vírus *Autographa californica* NPV, *Galleria mellonella* NPV, *Trichoplusia ni* NPV, *Lymantria dispar* NPV, *Orgyia pseudotsugata* NPV e *Helicoverpa armigera* NPV (Fraser *et al*, 1983, 1985; Wang *et al*, 1989; Potter *et al*, 1976; Slavicek *et al*, 1992; Russel e Rohrmann, 1993, Chakraborty e Reid, 1999). O mutante FP é caracterizado por um decréscimo na formação de poliedros e um aumento na formação de partículas virais formadas por brotamento da célula denominada “Budded Virus” (BVs). Os poliedros produzidos praticamente não contêm vírions e possuem baixa ou nenhuma infectividade. Durante passagem seriada do vírus em sistema *in vitro*, mutantes FP tornam-se rapidamente predominantes como consequência do aumento da produção de BVs. A formação desses mutantes tem sido correlacionada a ausência de uma proteína de 25 kDa, devido a mutações bem como a presença de grandes inserções ou deleções em uma região específica do genoma viral. Essa região contém o locus do gene *25K FP* que é essencial para a oclusão viral e formação do poliedro (Beames e Summers, 1988, 1989).

Outro tipo freqüente de alteração genética é a produção de Partículas Interferentes Defectivas (DIPs). Essas partículas contêm apenas parte do genoma viral, replicam mais rapidamente que o vírus padrão e precisam de um vírus intacto como um “helper” (Kool et al, 1991). A maioria das partículas defectivas está presente em altas passagens do vírus e são produzidas rapidamente quando é usado um alto valor de multiplicidade de infecção (MOI).

O maior problema devido ao “efeito passagem” na replicação de baculovirus e na sua expressão é a perda da virulência dos poliedros, quando se visa a produção do vírus em cultivos celulares. No caso de expressão gênica utilizando vírus recombinantes há interferência também na capacidade do vírus de produzir a proteína de interesse.

No Brasil, o vírus AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus) tem sido utilizado com sucesso para o controle da lagarta da soja (Moscardi, 1999). Atualmente, a produção viral é feita *in vivo* pela infecção de lagartas no campo. O bioinseticida denominado baculovirus anticarsia é aplicado anualmente em uma área de dois milhões de hectares de soja. A produção de AgMNPV *in vitro* torna-se portanto uma estratégia interessante por evitar possíveis contaminantes do campo e por não depender da ocorrência da lagarta hospedeira para multiplicação do vírus.

Neste trabalho, foi identificado e seqüenciado o gene 25K *FP* de um clone viral obtido por “plaque assay” denominado AgMNPV 2D (Johnson & Maruniak, 1989). Esses resultados fazem parte de estudos que estão sendo conduzidos para caracterização de mutantes decorrentes da passagem seriada de AgMNPV em três diferentes linhagens celulares: *Anticarsia gemmatalis* (UFLAG 2.86), *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) e *Trichoplusia ni* – High Five (Tn-5B1-4).

Material e Métodos

Vírus

O isolado viral AgMNPV 2D, obtido por purificação utilizando-se "plaque-assay", e a biblioteca genômica do vírus com a enzima de restrição *HindIII* foram fornecidos pelo Dr. James Maruniak da Universidade da Florida (EUA).

Sonda de Oligonucleotídeos HsNPV 25K FP

Uma sonda de oligonucleotídeos do *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) foi sintetizada utilizando primers para amplificação por PCR, gerando um produto de aproximadamente 1,1 kb, contendo a sequência *downstream* e *upstream* do gene *25K FP* (Tabela 1). O produto amplificado por PCR, foi clonado no vetor pGEM®-T (Promega). A sonda foi marcada radioativamente com ^{32}P -dCTP utilizando o kit "random prime labelling system" (Amersham).

Tabela 1

Nome	Número de oligonucleotídeos	Seqüência (5'-3')	Direção
Primer 1	18	ACGGACTGGATGAGCTTC	Downstream
Primer 2	18	CGGTACTCGGTAAATCTG	Upstream

Hibridização Southern Blot

A análise dos fragmentos de DNA por hibridização foi feita de acordo com Southern (1975). O DNA de AgMNPV foi extraído por ciclos sucessivos de fenol-clorofórmio, digerido com as enzimas de restrição *HindIII*, *EcoRI*, *BstEI* e *PstI* e os

fragmentos de DNA separados por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel contendo o perfil de restrição foi submetido a desnaturação e transferido para uma membrana de nylon. A membrana foi então hibridizada com a sonda de 25K *FP* de HaSNPV, marcada com P³²-dCTP, a 48 °C e exposta a um filme de raio-X.

Análise da Sequência

O DNA de clones *HindIII*-R e *HindIII*-S da biblioteca genômica de AgMNPV 2D foi purificado e suas extremidades seqüenciadas. A seqüência parcial foi obtida utilizando o método de terminação em cadeia “dye terminator chemistry” em equipamento ABI 377. Os cromatogramas resultantes foram analisados usando o software phred, montados usando o phrad (Ewing *et al*, 1998, Ewing & Green, 1998) e a montagem inspecionada com uso do consed (Gordon *et al*, 2001). A análise feita no banco de dados GenBank (Benson *et al*, 2002) utilizando NCBI-Blast (Altschul *et al*, 1997) forneceu dezoito seqüências altamente similares ao gene 25K *FP* de AgMNPV. O programa ClustalX (Thompson *et al*, 1997) foi utilizado para gerar o alinhamento das dezenove seqüências. As análises filogenéticas e de evolução molecular foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 2.1 (Kumar *et al*, 2001).

Resultados e Discussão

A passagem seriada de NPVs por diversas vezes em de células de insetos pode resultar em uma variedade de mutações que interferem na produção do vírus. Nesse trabalho são apresentadas a localização e seqüenciamento do gene 25 K *FP* do vírus AgMNPV. Sabe-se que a alteração nesse gene devido a fatores

tais como mutação, deleção ou inserção de transposons leva a formação de mutantes FP.

A localização do gene *25K FP* de AgMNPV 2D foi feita por *Southern Blotting* na qual os fragmentos de DNA do vírus, gerados após digestão com diferentes enzimas de restrição, foram separados por eletroforese e hibridizados com a sonda do gene *25K FP* de HaSNPV. Sinais de hibridização podem ser observados nos fragmentos de AgMNPV de *HindIII-R* e *HindIII-S* (co-migração em gel), *EcoRI-B*, *BstEI-B* e *PstI-A* (Fig. 1A e 1B).

A sequência completa do gene foi determinada após seqüenciamento dos fragmentos *HindIII-R* e *HindIII-S* da biblioteca genômica (Fig. 2). A ORF (open reading frame) do gene *25K FP* de AgMNPV possui 627 pb, codificando 208 aminoácidos. O gene apresenta 97 pb localizados no fragmento *HindIII-S* (N-terminal) e 530 pb no fragmento *HindIII-R* (C-terminal).

A árvore filogenética para o gene *25K FP* foi então construída através do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína 25KD de outros baculovirus, como apresentado na Figura 3. Baseado nesta árvore, AgMNPV está mais proximamente relacionado de *Epiphyas postvittana* MNPV, *Orgyia pseudotsugata* MNPV e *Choristoneura fumiferana* MNPV. As seguintes identidades foram encontradas no alinhamento da proteína 25K de diversos nucleopoliedrovirus: 83% *Epiphyas postvittana* MNPV, 79% *Orgyia pseudotsugata* MNPV, 76% *Choristoneura fumiferana* MNPV, 72% *Autographa californica* MNPV e *Rachiplusia ou* MNPV, 70% *Bombyx mori* NPV, 62% *Helicoverpa armigera* SNPV e *Helicoverpa zea* SNPV, 61% *Mamestra configurata* MNPV, 61% *Spodoptera exigua* MNPV, 57% *Spodoptera litura*

MNPV, 52% *Ad honmai* MNPV e 52% *Lymantria dispar* MNPV. Valores baixos de identidade foram encontrados em relação aos granulovirus.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L. SCHÄFFER, A. A. ZHANG, J. ZHANG, Z. MILLER, W.; LIPMAN D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BEAMES, B.; SUMMERS M D. Comparisons of host cell DNA insertions and altered transcription at the site of insertions in few polyhedra baculovirus mutants. **Virology**, San Diego, CA, v. 162, p. 206-220, 1988.

BEAMES, B.; SUMMERS, M. D. Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants. **Virology**, San Diego, CA, v. 168, p. 344-353, 1989.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A. ;WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, UK, v. 30, p. 17-20, 2002.

CHAKRABORTY, S.; REID, S. Serial passage of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* cell cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, CA, v. 73, p. 303-308, 1999.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, NY, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, NY, v. 8, p. 175-185, 1998.

FRASER, M. J.; BRUSCA, J. S.; SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D. Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus. **Virology**, San Diego, CA, v. 145, p. 356-361, 1985.

FRASER, M. J.; SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 47, p. 287-300, 1983.

GORDON, D.; DESMARAIS, C.; GREEN, P. Automated Finishing with Autofinish. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, NY, v. 11, n. 4, p. 614-625, 2001.

JOHNSON, D. W.; MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatilis* Nuclear Polyhedrosis Virus (AgMNPV-2) DNA. **Journal of General Virology**, Reading, UK, v. 70, p. 1877-1883, 1989.

KOOL, M.; VONCKEN, J. W.; VAN LIER, F. L. J.; TRAMPER, J.; VLAK, J. M.

Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. **Virology**, San Diego, CA, v. 183, p. 739-746, 1991.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.; NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculovirus for control of lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, CA, v. 44, p. 257-289, 1999.

POTTER, K. N.; FAULKNER, P.; MacKINNON, E. A. Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 18, p. 1040-1050, 1976.

RUSSELL, R. L. Q.; ROHRMANN, G. F. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. **Virology**, San Diego, CA, v. 195, p. 532-540, 1993.

SLAVICEK, J. M.; PODGWAITE, J.; LANNERHERRERA, C. Properties of two *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis-virus isolates obtained from the microbial pesticide Gypchek. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, CA, v. 59, p. 142-148, 1992.

SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, p. 503-517, 1975.

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

WANG, H. G.; FRASER, M. J.; CARY, L. C. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of TFP3 lepidopteran transposon insertions at the FP locus of nuclear polyhedrosis viruses. **Gene**, Amsterdam, v. 81, p. 97-108, 1989.