

**Identificação de um gene de virulência
(p74) de um vírus isolado da lagarta-do-
álamo *Condylorrhiza vestigialis***

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

ISSN 0102 0110
Novembro, 2007

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 189

**Identificação de um gene de virulência
(*p74*) de um vírus isolado da lagarta-do-
álamo *Condylorrhiza vestigialis***

**Geraldo F. Almeida
Felipe R. da Silva
Marlinda L. Souza
Maria Elita B. Castro**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 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

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

I 19 Identificação de um gene de virulência (p74) de um vírus isolado da lagarta-do-álamo *Condyloporrhiza vestigialis*. / Geraldo Furtado Almeida ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
16 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 189)

1. Baculovirus – inseticida químico. 2. Gene p74. 3. Infectividade oral 4. Inseto. 4. Controle biológico. 5. *Condyloporrhiza vestigialis*. 6. *Populus*. I. Almeida, Gabriel Furtado. II. Série.

628.9657 – CDD 21.

Identificação de um gene de virulência (*p74*) de um vírus isolado da lagarta-do-álamo *Condylorrhiza vestigialis*

Geraldo F. Almeida¹
Felipe R. da Silva²
Marlinda L. Souza³
Maria Elita B. Castro³

Resumo

Os baculovirus constituem um importante grupo de vírus entomopatogênicos que durante o ciclo replicativo produzem dois diferentes fenótipos virais. Os vírions derivados de corpos de oclusão (*occlusion-derived virions* ODV), imersos em uma matriz protéica cristalina chamada corpo de oclusão, e os vírus extracelulares (*budded virions* BV) envoltos por um envelope obtido de um brotamento da membrana plasmática. Estas formas virais são geneticamente idênticas, mas diferem na composição de seus envelopes e na sua função. A proteína P74, associada aos envelopes dos ODV, é essencial para a infectividade oral dos baculovirus. Neste trabalho procurou-se verificar a presença do gene *p74* no genoma de *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV), um baculovirus recentemente identificado no Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para identificação desse gene (*p74*), DNA de CvMNPV foi digerido com diferentes endonucleases de restrição, analisado por eletroforese em gel de agarose, e então transferido para uma membrana de nylon para experimentos de hibridização *Southern blot*. Como sonda foi utilizado o produto de PCR, obtido de ampliações de *primers* internos do gene *p74* de CvMNPV construídos com base no alinhamento e comparação de sequências conservadas dos genes *p74* de baculovirus disponíveis no *GenBank*. Os fragmentos hibridizados foram selecionados e inseridos no vetor de clonagem pBluescript e amplificados por transformação de células competentes (XL-1-Blue - *E. coli*). Quatro fragmentos de restrição contendo o gene *p74* foram identificados: *EcoRI* 3,2kb, *HindIII* 1,0 e 1,1kb, e *PstI* 3,8kb. Esses resultados mostram que o gene *p74* está presente no genoma do baculovirus CvMNPV. Este fato era esperado por se tratar de um gene altamente conservado entre todos os baculovirus até então seqüenciados. Os fragmentos de DNA clonados estão sendo seqüenciados para determinação da seqüência nucleotídica completa do gene *p74* de CvMNPV. Essas informações contribuirão para melhor caracterização de um novo vírus (NPV, família

¹ Biólogo, mestrando, Universidade de Brasília / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Biólogo, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Baculoviridae) cujo hospedeiro é uma praga de uma espécie florestal de grande importância econômica conhecida no Brasil como Álamo ou Choupo (*Populus* sp, família Salicaceae).

Palavras-chave: baculovirus, gene *p74*, infectividade oral, *Condylorrhiza vestigialis*, *Populus*.

Abstract

The baculoviruses constitute an important group of entomopathogenic virus that during their replicative cycle produce two distinct infectious phenotypes. The occlusion-derived virions (ODV) embedded into a crystalline protein matrix called occlusion body and the budded virions (BV) enclosed in an envelope obtained by budding at the plasma membrane. These viral forms are genetically identical, but differ in the composition and function of their envelopes. The protein P74 is associated with the ODV envelope and is essential for *per os* infectivity of the baculoviruses. The objective this work was verify the presence of the *p74* gene in the *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV) genome, a baculovirus identified recently by the Insect Virology Laboratory of the Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. For the identification this gene (*p74*), CvMNPV DNA was digested with different restriction endonucleases, analysed by agarose gel electrophoresis, and than transferred to a nylon membrane for *Southern blot* hybridization assays. As probe was utilized the PCR product, obtained from amplification of a *p74* internal region of CvMNPV constructed with base on the alignment and comparison of conserved sequences of baculovirus *p74* genes available in GenBank. The hybridized fragments were selected and cloned into a pBluescript cloning vector and transformed into *E. coli* XL-1-Blue. Four restriction fragments containing the *p74* gene were identified: 3.2kb *EcoRI*, 1.0 and 1.1kb *HindIII* and 3.8kb *PstI*. These results show that the *p74* gene is present in the CvMNPV genome. It was expected, since this gene is highly conserved among all baculoviruses sequenced to date. The cloned DNA restriction fragments are being sequenced for determination of the complete nucleotide sequence of CvMNPV *p74* gene. These findings will contribute to better characterization of a new virus (NPV, family *Baculoviridae*) which host is an insect pest of an economically important forest specie known in Brazil as Alamo or Choupo (*Populus* sp, family Salicaceae).

Key words: baculovirus, *p74* gene, oral infectivity, *Condylorrhiza vestigialis*, *Populus*.

Introdução

Atualmente são reconhecidas dezessete famílias de vírus de inseto, sendo a família dos baculovirus a de maior importância. A família *Baculoviridae* é um grupo de vírus entomopatogênicos que infectam artrópodes, principalmente insetos da ordem Lepidoptera, podendo ocorrer ainda em Hymenoptera, Diptera e alguns crustáceos da ordem Decapoda (Theilmann *et al.*, 2005). O tamanho, a forma e a localização intracelular dos corpos de oclusão (OB) determinam a classificação taxonômica dessa família em dois gêneros: os *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e os *Granulovirus* (GV) (Theilmann *et al.*, 2005). Outra diferença marcante entre estes dois gêneros é a proteína estrutural presente na oclusão cristalina do vírus, a qual é essencial para proteger os vírions da inativação pelas condições ambientais e permite a preservação da sua capacidade de replicação. Assim, enquanto que nos vírus NPV a proteína presente em grande quantidade é a poliedrina, nos GV é a granulina. Estudos filogenéticos de baculovirus, utilizando o gene da poliedrina e posteriormente outros genes conservados, propuseram uma subdivisão dos NPV em Grupo I e Grupo II (Zanotto *et al.*, 1993; revisado por Herniou *et al.*, 2003).

Os baculovirus são caracterizados por partículas virais baciliformes (nucleocapsídeo em forma de bastão), envoltos por um envelope membranoso e ocluso em uma matriz protéica. Os vírions, que variam em quantidade por oclusão cristalina, contêm DNA fita dupla circular, com tamanho genômico variável entre as diferentes espécies, de 80 a 180 kb (Theilmann *et al.*, 2005). Diferentemente de outras famílias de vírus, os baculovirus apresentam dois fenótipos: *budded virus* (BV) e *occlusion-derived virus* (ODV) (Slack *et al.*, 2001), os quais são estruturalmente e funcionalmente distintos em seus ciclos de infecção (Zhou *et al.*, 2005). Os ODV estabelecem a primeira fase de infecção dentro da larva hospedeira (infecção primária) e são responsáveis pela transmissão horizontal da infecção, ou seja, transmitem os vírions entre os insetos hospedeiros, o que garante a permanência do vírus no ambiente. Os BV estabelecem a segunda fase de infecção (infecção secundária), sendo responsáveis pela infecção sistêmica no hospedeiro (célula-célula) e também em cultura de células. Assim, Cada fenótipo viral realiza suas funções sob condições ambientais diferentes e infectam tipos distintos de células (Haas-Stapleton *et al.*, 2004). Outra diferença marcante que tem sido constatada entre os dois fenótipos é o mecanismo pelo qual cada um deles entra em sua célula-alvo específica. Enquanto a entrada dos BV nas células hospedeiras ocorre por meio de uma endocitose adsorptiva (Volkman *et al.*, 1986) dependente de pH baixo (Blissard *et al.*, 1992), os ODV entram nas células epiteliais do intestino médio por fusão direta de membrana na superfície celular (Summers, 1971; Granados, 1978; Granados e Lawler, 1981).

A principal rota de infecção dos baculovirus envolve o fenótipo ODV. Na natureza, a infecção primária começa no intestino médio da larva após a ingestão de poliedros (OB) presentes, por exemplo, na superfície das folhas existentes no campo. O intestino médio

constitui uma região bastante favorável à entrada do vírus, uma vez que o intestino anterior e o posterior são recobertos por uma cutícula, considerada uma barreira física à infecção (Bilimoria, 1991; Tanada e Kaya, 1993). Assim, o ambiente altamente alcalino encontrado no intestino médio da larva e proteinases ali presentes desencadeiam a dissolução destes poliedros e conseqüentemente a liberação dos ODV infecciosos no lúmen digestivo (Haas-Stapleton *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). Os ODV liberados atravessam a membrana peritrófica do epitélio do intestino médio, uma espécie de matriz extracelular glicoprotéica e fazem contato com as microvilosidades apicais das células colunares (BBMVs), afim de estabelecer a infecção (Federici, 1997; Haas-Stapleton *et al.*, 2004). Neste momento, o envelope do ODV interage com a membrana das células colunares e por fusão direta com essa membrana os vírions são desempacotados e penetram na célula via endossomo (Slack *et al.*, 2001). Os nucleocapsídeos escapam dos endossomos e agora livres no citoplasma, podem seguir duas vias distintas: podem ser transportados para o núcleo das células colunares, iniciando a replicação de novos nucleocapsídeos ou podem migrar diretamente para a membrana plasmática baso-lateral, de onde brotam e já iniciam a infecção sistêmica. Os novos nucleocapsídeos que se formam no núcleo celular, também brotam pela membrana baso-lateral da célula hospedeira e adquirem um envelope lipídico com proteínas codificadas pelo próprio vírus, formando os vírus extracelulares ou *budded virus* (BV) (Bilimoria, 1991; O'Reilly *et al.*, 1992; Faulkner *et al.*, 1997). Tanto os BV que foram produzidos no núcleo, quanto àqueles que passaram diretamente pelas células colunares, penetram na hemolinfa via membrana baso-lateral, infectam os hemócitos e invadem o sistema traqueal do inseto, onde se espalham pelos túbulos de malpighi, tecido muscular, tecido adiposo e outros tecidos, até culminar na morte da lagarta hospedeira (Zhou *et al.*, 2005) (figura 1). À medida que os BV vão se multiplicando dentro das células colunares do intestino médio do inseto e se espalhando por outros tecidos, a quantidade de OB formados aumenta no interior do núcleo das células, causando sua hipertrofia e posteriormente a lise celular (Ganados e Williams, 1986). Estes efeitos citopáticos causados pela infecção em sinergismo com a atividade das quitinases (Chi A) e de proteases (V-Cath) virais causam a morte e a liquefação do tecido da larva, liberando bilhões de poliedros no meio ambiente (Slack *et al.*, 2001). Estes poliedros, por sua vez, podem infectar outros insetos e garantir a existência do ciclo de replicação do vírus na natureza.

Como apresentam fenótipos diferentes, ODV e BV possuem conjuntos protéicos distintos. Embora seus nucleocapsídeos sejam similares em estrutura, possuindo genótipos idênticos, as duas formas virais diferem na composição de seus envelopes. Por sobreviverem em ambientes distintos, infectarem células-alvo diferentes e possuírem funções diferentes, é de se esperar que cada tipo de forma infectiva possua proteínas específicas (Kikhno *et al.*, 2002). Este conjunto protéico de cada uma das formas virais, principalmente as proteínas com projeções extracelulares, que irão ser responsáveis pela especificidade dos processos

de entrada do ODV e BV na célula e conseqüentemente, caracterizarem a infecção primária e secundária.

Como já foi demonstrado em estudos de microscopia eletrônica, os ODV adquirem seu envelope lipoprotéico no interior do núcleo – na “zona do anel intranuclear” (Tanada e Hess, 1976). Ao contrário dos BV, o fenótipo ODV tem uma estrutura mais complexa e contém várias proteínas, compreendendo entre 31 a 44 proteínas, dependendo do método de identificação utilizado (Braunagel *et al*, 2003). Não se sabe ao certo a totalidade de proteínas envolvidas no processo de interação, fusão e penetração da partícula ODV, mas muitos polipeptídeos de função não totalmente conhecida têm sido identificados no envelope ODV (Rohrmann, 1992). Entre estas proteínas se destaca a P74, um produto de fator gênico de infectividade oral (PIF) altamente conservado, que é essencial para a infectividade dos ODV, mas completamente dispensáveis para a infectividade de BV (Hass-Stapleton *et al.*, 2004).

O gene de virulência *p74* é do tipo *very late* e foi o primeiro gene *pif* a ser relatado (Kuzio *et al.*, 1989). Este gene codifica uma proteína integral de membrana de 74 kDa, ancorada no envelope ODV através de sua extremidade hidrofóbica C-terminal e expondo na superfície do vírion sua extremidade hidrofílica N-terminal (Faulkner *et al.*, 1997; Beilach *et al.*, 2006). A proteína P74 participa do processo de interação ODV x células colunares do intestino médio da larva, podendo estar individualmente ou cooperativamente com outras proteínas (PIF, PIF-2, ODV-E66, ODV-E25...) envolvida nos eventos iniciais da infecção oral no inseto (Slack *et al*, 2001; Rashidan *et al*, 2003). Experimentos recentes indicaram que o gene *p74* não afeta a produção e nem a montagem dos BV e ODV e atualmente acredita-se que a proteína P74 funciona *somente* como um “ligante-chave”, o qual provavelmente se liga a um receptor específico presente na membrana plasmática das células epiteliais colunares do intestino médio das larvas (Horton e Burand, 1993; Zhou *et al.*, 2005). Faulkner e colaboradores, em 1997, propuseram para este polipeptídeo outras funções que facilitariam a infecção, tais como o envolvimento na dissolução de OB e alteração da membrana peritrófica.

O Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia identificou recentemente um vírus então denominado de *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV) que se apresenta como uma alternativa promissora para o controle da lagarta *Condylorrhiza vestigialis*. O interesse pelo uso desse vírus como bioinseticida tem sido crescente, principalmente, por se tratar de uma praga que causa sérios danos à cultura do álamo, uma espécie florestal de alta importância econômica mediante a sua utilização na indústria de palitos, farmacêutica e na produção de biocombustível. Essa planta, também conhecida como choupo, pertence ao gênero *Populus* (família: Salicaceae) e é encontrada principalmente na região sul do Brasil, Europa, América do Norte e oeste da Ásia (May-de Mio e Amorim, 2000).

Diante da relevância e potencial do baculovirus identificado (CvMNPV), estudos vêm sendo conduzidos visando sua caracterização com base em análises morfológica, bioquímica e

molecular. Como parte desse propósito, o presente trabalho foi realizado para identificar e clonar os fragmentos de restrição contendo o gene de virulência *p74* de CvMNPV, para então sequenciamento e análise do gene, dados estes que servirão para os estudos de filogenia do vírus.

METODOLOGIA

Insetos e vírus - O baculovirus CvMNPV (*Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus*) utilizado neste trabalho foi obtido de lagartas *Condylorrhiza vestigialis* infectadas, gentilmente cedidas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) e pela empresa Swedish Match do Brasil S.A, por intermédio do Dr. Nilton José Sousa e Edilene Buriti Machado, respectivamente.

Purificação de partículas virais e extração de DNA (Maruniak *et al.*, 1984; O'Reilly *et al.*, 1992) - Os poliedros de CvMNPV foram obtidos a partir de lagartas *Condylorrhiza vestigialis* maceradas em tampão de homogeneização (1% de ácido ascórbico, 2% de SDS, 0.01M Tris, pH 7.8; 0.001M EDTA), concentrado por sucessivas centrifugações e purificados por ultracentrifugação em gradiente de sacarose (1,17 - 1,30 mg/ml). Para a solubilização dos poliedros, foram adicionados 250 μ l de solução alcalina 3X (0.3M Na₂CO₃, 0.51M NaCl, 0.03M EDTA) aos 500 μ l de suspensão viral (1x10⁹ PIBs/ml) e incubados a 37°C por 30 min ou até a dissolução completa dos PIB. Em seguida, foram adicionados 50 μ l de SDS 20% e, após 10 min, foram acrescentados 12,5 μ l de proteinase K (20 mg/ml), mantendo a incubação a 37°C por pelo menos 16h. Para a extração do DNA viral foi adicionado ao sobrenadante igual volume de fenol, sendo este centrifugado por 5 min a 14.000 rpm, após a homogeneização das fases. A fase aquosa (topo do tubo) coletada foi submetida ao mesmo procedimento para mais duas extrações, com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto (gelado) e 10% de acetato de sódio 3M, pH 5,2, seguido de incubação a -20°C por 14 - 16h. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 min e o pellet obtido foi lavado com etanol 70% (gelado), seco à temperatura ambiente, ressuspenso em tampão TE (0.01M Tris, pH 7.8; 0.001M EDTA), e incubado com RNAase (10 mg/ml), em banho-maria, a 37°C durante 1 h. O DNA foi estocado a -4°C até a sua utilização.

Amplificação da região interna do gene p74 (PCR – polymerase chain reaction) - dois pares de primers foram construídos baseados no alinhamento e comparação de sequências conservadas de genes *p74* de baculovirus disponíveis no GenBank/EMBL, utilizando os programas computacionais BLASTN (Altshul *et al.*, 1990) e CLUSTALX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997). Esses primers foram então amplificados por PCR com Taq DNA polimerase usando como template o DNA de CvMNPV. A reação PCR foi preparada para 35 ciclos,

utilizando diferentes temperaturas de anelamento para otimização do processo (58 a 66°C). Considerando que ainda não está determinado em que grupo do NPV o baculovirus CvMNPV pertence, outros primers foram desenhados e testados para amplificação de fragmentos correspondentes ao gene *p74*. Um par de primers foi desenhado com base em seqüências de genes *p74* de NPV do grupo I e outro de NPV do grupo II. Estes primers foram também amplificados por reações de PCR e os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose. Os fragmentos resultantes de sistemas com melhor eficiência de amplificação da região do gene *p74* foram utilizados para preparação de sondas para hibridizações *Southern blot*.

Identificação e localização do gene *p74* por hibridização *Southern blot* – O DNA de CvMNPV foi digerido com endonucleases de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *PstI* e resolvidos por eletroforese em gel de agarose 0,8%, com voltagem média de 40V, por aproximadamente 15 h. Em seguida, o gel foi tratado com solução de depuração (HCl 0,25N) durante 15 min, solução de desnaturação (NaCl 0.5M; NaOH 0.5N) durante 45 min e solução de neutralização (Tris 1M, pH 7.4; NaCl 1.5M) por mais 45 min, acompanhado por intervalos de agitação, sendo que após cada tratamento o gel era lavado rapidamente com água deionizada. Antes de ser transferido para a membrana de nylon (Hybond N⁺) o gel foi tratado com solução de SSC 20X (NaCl 3M; citrato de sódio 0.3M, pH 7.0). Assim, uma espessa camada (8cm aproximadamente) formada pela membrana de nylon, papéis filtro e papéis absorventes foi colocada sobre o gel, para que se realizasse a transferência. Após 16 h de transferência, a membrana foi mergulhada em solução SSC 6X por 5 min e deixada para secar, sob papel filtro, por mais 30 min dentro da capela, para então fixá-la por irradiação UV durante 5 minutos. Em seguida, a membrana foi pré-hibridizada com uma solução SSC 6X - Denhard's 5X - SDS 0.5% durante 4 h a 68°C, para então ser hibridizada com uma sonda específica para o gene *p74* de CvMNPV (obtida por PCR). Esta sonda foi marcada radioativamente com [α -³²P] dCTP, utilizando o kit rediprime™ II (Armsham-Pharmacia) conforme instruções do fabricante. A hibridização foi conduzida a 68°C por 16 h, e a membrana então foi lavada 3 vezes em solução SSC 2X - SDS 0,1%, a 68°C por 30 min, rinsada com SSC 2X a temperatura ambiente e exposta ao filme raio-X Kodak T-Mat™ G/RA, a -80°C por cerca de 48 horas.

Isolamento de Fragmentos *EcoRI*, *HindIII* e *PstI* /*p74* - Após a localização do gene *p74* de CvMNPV por hibridização *Southern blot*, outro perfil de restrição do genoma de CvMNPV foi preparado, utilizando as mesmas enzimas (*EcoRI*, *HindIII* e *PstI*) e submetido a eletroforese em gel de agarose low melting point 0.8%. Assim, as bandas correspondentes aos fragmentos de restrição identificados no autoradiograma (*Southern blot*) do gene *p74* foram eluídos do gel.

Clonagem do gene *p74* de CvMNPV - Para a clonagem dos fragmentos, o plasmídeo pBluescript foi clivado com endonucleases de restrição (*EcoRI*, *HindIII* e *PstI*), tratado com fosfatase alcalina intestinal bovina (CIP) e ligado aos fragmentos de restrição / *p74* pela ação da T4 DNA ligase. Células competentes (*Escherichia coli*, linhagem XL-1-Blue), preparadas com cloreto de cálcio de acordo com Mandel e Higa (1970) foram transformadas por choque térmico (Sambrook *et al.* 1989) utilizando os plasmídeos recombinantes construídos. Em seguida estas células foram plaqueadas em meio LB sólido, contendo ampicilina (100µg/ml), X-GAL (25 µg/ml) e IPTG (20µg/ml), e incubadas a 37°C durante 14-16h para seleção dos clones positivos. Clones selecionados foram isolados e crescidos em meio LB líquido com ampicilina a 37°C, sob agitação de 200rpm durante 14-16h, para a extração de DNA plasmidial pelo método de minipreparação por lise alcalina. Posteriormente, a clonagem de DNA será confirmada por digestão do DNA plasmidial com endonucleases de restrição correspondentes ou/e amplificação por PCR, utilizando os primers universais T3 e T7. Após a confirmação da clonagem dos fragmentos de restrição de interesse, o DNA plasmidial será então tratado com o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* e enviado à Plataforma Genômica do CENARGEN, para o sequenciamento do gene *p74*, conforme procedimentos de rotina do laboratório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A realização de várias reações de PCR demonstrou que os *primers* dos NPV grupo I eram aqueles que forneciam fragmentos de tamanho mais aproximado ao do gene *p74*, o qual varia entre 1,8 a 2,1 Kb, e ao do produto esperado através do alinhamento da seqüência entre os *p74* homólogos, durante a construção dos *primers* (1.6 kb) (figura 1). Assim, é provável que o vírus CvMNPV pertença ao grupo I dos *nucleopolyhedrovirus*.

Os resultados mostraram que a sonda *p74*, obtida por PCR, hibridizou em fragmentos específicos nos diferentes perfis de restrição do genoma do vírus (figura 2). Embora o mapa físico de restrição do genoma de CvMNPV não esteja ainda estabelecido, é muito provável que o gene *p74* esteja localizado nos fragmentos *HindIII* – 1.1Kb e 1.0Kb, *PstI* – 3.8Kb, e *EcoRI* – 3.1Kb, onde fortes sinais de hibridização foram observados (figura 2, A). Outros sinais levemente detectados provavelmente se devem a hibridização inespecífica ou a possível ocorrência de DNA parcialmente digerido. A digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição específicas e a realização do PCR indicaram que os fragmentos *HindIII* e o fragmento *EcoRI* selecionados foram devidamente clonados no plasmídeo pBluescript (figura 3). Porém, a presença da seqüência nucleotídica do gene *p74* nestes fragmentos de restrição somente será confirmada após o sequenciamento.

Os fragmentos de restrição *HindIII*, *EcoRI* e *PstI* foram encaminhados para a Plataforma Genômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Assim, a seqüência nucleotídica do gene *p74* obtida será utilizada para análise filogenética do vírus CvMNPV,

por se tratar de um gene altamente conservado entre todos os baculovirus já seqüenciados. Portanto, os resultados deste estudo deverão contribuir para a caracterização deste novo vírus (CvMNPV), que surge como uma importante alternativa de uso em programas de controle da praga do álamo.

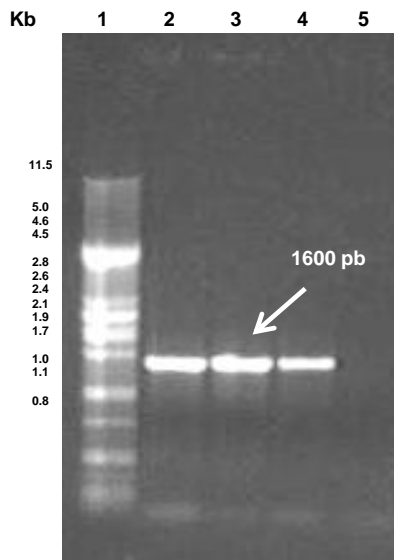


Figura 1. Amplificação da região interna do gene *p74*. Marcador molecular DNA λ *Pst*I (1). Fragmento do gene *p74* amplificado, em um sistema realizado em triplicada (2-4). Controle negativo do sistema de PCR (5)

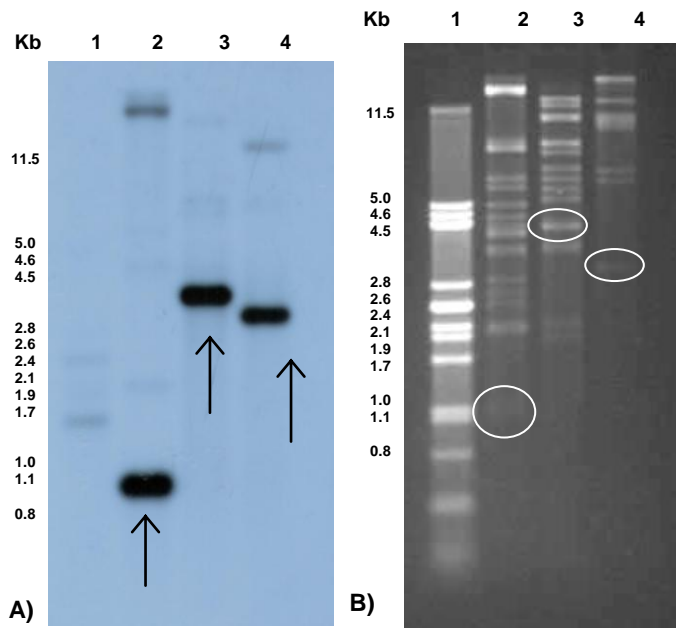


Figura 2. Autorradiograma do Southern Blot do DNA de CvMNPV (A). Perfil de restrição de DNA de CvMNPV (B). Marcador molecular DNA λ *Pst*I (1), DNA de CvMNPV digerido com *Hind*III, *Pst*I e *Eco*RI, respectivamente (2 a 4). As setas mostram os sinais mais intensos de hibridização da sonda *p74* radioativa com DNA genômico de CvMNPV digerido com as diferentes endonucleases de restrição. Os círculos indicam os respectivos locais onde ocorreu a hibridização.

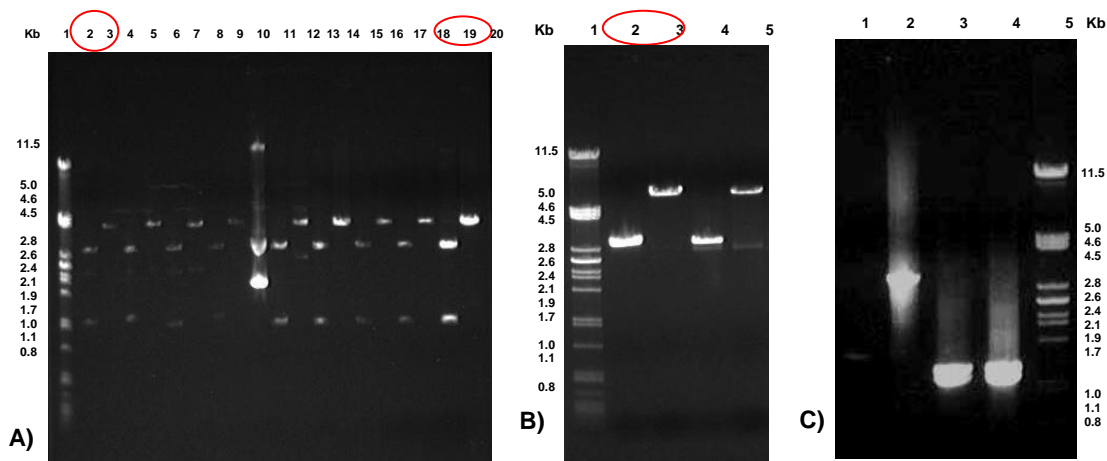


Figura 3. Confirmação da clonagem dos fragmentos de restrição, contendo o gene *p74*, no plasmídeo pBluescript (pBS). (A) pBS + fragmento *Hind*III 1.1Kb e pBS + *Hind*III 1.0Kb, clivados com *Hind*III e *Pst*I. Marcador molecular DNA *N*/*Pst*I (1). Inseto *Hind*III 1.1KB (poços 2, 4, 6, 8), inseto *Hind*III 1.0Kb (poços 11, 13, 15, 17,19). Inseto *Hind*III 1.1Kb + pBS 3Kb (poços 3, 5, 7, 9), inseto *H*nd III 1.0Kb + pBS 3Kb (poços 12, 14, 16, 18). Plasmídeo intacto (10). (B) pBS + fragmento *Eco*RI 3.1Kb clivado com *Eco*RI e *Bam*HI. Marcador molecular DNA *N*/*Pst*I (1). Inseto *Eco*RI 3.1Kb (2 e 4). Inseto 3.1Kb + 3Kb (3 e 5). Os círculos vermelhos indicam os plasmídeos recombinantes clonados que foram selecionados para o seqüenciamento. (C) Amplificação por PCR dos fragmentos de restrição inseridos no pBS dos clones selecionados. Fragmento *Eco*RI 3.1Kb, utilizando os primers internos do gene *p74* e os primers universais, respectivamente (1 e 2). Fragmentos *Hind*III 1.1Kb e 1.0Kb, utilizando primers universais, respectivamente (3 e 4). Marcador molecular DNA *N*/*Pst*I (5).

Referências Bibliográficas

- Altshul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment searching tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Beilach, M. N., Rodríguez, V., Bilen, M. F., Pilloff, M. G., Ramanowski, V., Sciocco-Cap, A. & Ghiringhelli, P. D. (2006). Sequencing and characterization of *p74* gene in two isolates of *Anticarsia gemmatalis* MNPV. *Virus Gene* 32: 59-70.
- Bilimoria, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: Kurstak, E. (Ed.). *Viruses of Invertebrates*. New York: Marcel Dekker, 1991. p.1-72.
- Blissard, G. W., Wenz, J. R. (1992). Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology* 66: 6829-6835.
- Braunagel, S. C., Russel, W. K., Rosas-Acosta, G., Russel, D. H., Summers, M. D. (2003). Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 9797-9802.
- Faulkner, P., Kuzio, J., Williams, G. V., Wilson, J. A. (1997). Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *Journal of General Virology* 78: 3091-3100.
- Federici, B. A. Baculovirus Pathogenesis. In: Miller L. K. (Ed.). *The Baculoviruses*. New York: Plenum Press, 1997, p. 33-59.
- Granados, R. R. & Lawler, K. A. (1981). *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108: 297-308
- Granados, R. R. (1978). Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology* 90:170-174.

Granados, R. R.; Williams, K. A. *In vivo* Infection and replication of baculoviruses, In: Granados, R. R.; Federici, B. A. (Ed.) *The Biology of Baculoviruses*, Vol 1, Biological Properties and Molecular Biology. Boca Raton: CRC Press. 1986. v.1, p. 89-108.

Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O., Volkman, L. E. (2004). P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Virology* 78: 6786–6791.

Herniou, E. A.; Olszewski, J. A.; Cory, J. S.; O'Reilly, R. D. (2003). The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology*. 48: 211-34.

Horton, H. M., Burand, J. P. (1993). Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of Virology* 67: 1860-1868.

Kikhno, I., Gutierrez, S., Croizier, L., Croizier, G., López Ferber, M. (2002). Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 83: 3013–3022.

Kuzio, J., Jacques, R., Faulkner, P. (1989). Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* 173:759-763.

Mandel, M.; Higa, A (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal Molecular Biology*. 53: 159-62.

Maruniak, J. E., Brown, S. E., Knudson, D. L. (1984). Physical Maps of SfMNPV Baculovirus DNA and Its Genomic Variants. *Virology* 136: 221-234.

May-de Mio, L. L.; Amorim, L. *Revista Floresta: Doenças do álamo*. v. 30. 2000.

O'Reilly, D. R., Miller, L. K., Luckow, V. A. *Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman. 1992. 347p.

Rashidan, K. K., Nassoury, N., Tazi, S., Giannopoulos, P. N., Guertin, C. (2003). *Choristoneura fumiferana* Granulovirus P74 Protein, a Highly Conserved Baculoviral Envelope Protein. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36: 475-487.

Rohrmann, G. F. (1992). Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology* 73: 749-761.

Sambrook, J.; Fritsh, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor. 1989.

Slack, J. M., Dougherty, E. M. & Lawrence, S. D. (2001). A study of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV envelope protein P74 using a GFP tag. *Journal of General Virology* 82: 2279-2287.

Summers, M.D., J. (1971). Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *Journal of Ultrastructure Research* 35:606–625.

Tanada, Y. E., Hess, R. T. (1976). Development of a nuclear polyhedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 28: 67-76.

Tanada, Y; Kaya H. K. DNA-viral infections: Baculoviridae. In: Tanada, Y., Kaya H.K. (Eds.). *Insect Pathology*. San Diego: Academic Press. 1993, p.171-244.

Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G. F., Thiem, S., Vlak, J.M. (2005). In: *Baculoviridae. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Fauquet, C. M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 1259p. *Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press. p.177-186.

Thompson J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. *Nucleic Acids Research* 25: 4876 - 4882.

Volkman, L. E., Goldsmith, P. A., Hess, R. T. (1986). Alternate pathway of entry of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: fusion at the plasma membrane. *Virology* 148: 288-297.

Zhou, W., Yao L., Xu H., Yan F., Qi Y. (2005). The function of envelope protein P74 from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in primary infection to host. *Virus Genes* 30: 139-150.

Zanotto, P. M. A., Kessing, B. D., Maruniak, J. E. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: Evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 147-164.