



# Universidade de Brasília

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular

## **Análise do impacto da deleção do gene *p94 (ac134)* de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus***

Miguel de Souza Andrade

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Co-orientador: Dr Fernando Lucas Melo.

Brasília, 2015



# Universidade de Brasília

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular

## **Análise do impacto da deleção do gene *p94 (ac134)* de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus***

Miguel de Souza Andrade

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Co-orientador: Dr Fernando Lucas Melo.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 2015

# Miguel de Souza Andrade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Orientador) (CEL – UnB)

---

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brigido (CEL – UnB)

---

Dra. Simone da Graça Ribeiro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

---

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (Suplente) (CEL – UnB)

*"Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution"*

Theodosius Dobzhansky

**Aos meus pais, João e Erenilsa, que me incentivaram a estudar.**  
**Às minhas irmãs, Eliene, Elaine e Camila, as melhores irmãs do mundo.**  
**À minha esposa, Mara, que tanto amo.**

## AGRADECIMENTOS

*Começo agradecendo imensamente ao professor Bergmann, que me acolheu no Laboratório de Baculovírus e sempre teve muita paciência comigo. É um exemplo de profissional. Quando crescer quero ser como o senhor.*

*Agradeço ao meu coorientador Fernando pelas broncas e puxões de orelha, eles foram importantes para o meu crescimento. Pelo TWIV e por me fazer ver a ciência de uma outra forma.*

*Agradeço aos membros da banca, Dr. Simone, Prof. Marcelo e prof. Tatsuya.*

*Agradeço ao Daniel e ao Roberto, pelo exemplo, amizade e ajuda.*

*Agradeço também ao pessoal do lab, Fabrício, Leonardo, Mayarha, Lorena, Laís, Luiza, Cláudia, Deborah (obrigado, deb), aos que já saíram do lab e à aqueles de outros laboratórios que me ajudaram.*

*Agradeço aos meus amigos de graduação e mestrado Rafael, Raffael, e Raquel, pela paciência com os trabalhos acadêmicos e pela amizade dentro e fora de sala. Vocês ficarão no meu coração para sempre e do outro lado do corredor durante o doutorado.*

*Agradeço às minhas irmãs Eliene, Elaine e Camila pela melhor infância que alguém pode ter. Amo vocês. Exemplos de vida! Minhas heroínas.*

*Agradeço ao meu pai e à minha mãe por terem me educado e me incentivado a estudar mais e mais. O apoio de vocês foi fundamental ao longo de todo o meu processo de aprendizagem dentro e fora da escola. Muito obrigado, amo vocês.*

*Agradeço à minha esposa Mara, que é minha eterna companheira, amiga, namorada, esposa e futura mamãe dos meus filhinhos... Por toda a paciência enquanto eu escrevia esta dissertação... Por me acompanhar e me ajudar em experimentos, mesmo quando estava exausta depois de um longo dia de trabalho e estudo. Você é parte da minha vida e parte de mim. Te amo!*

*Agradeço por ultimo a Deus, pela existência de todas as coisas e por me permitir investigar e contemplar a sua obra.*

# ÍNDICE

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | ÍNDICE DE FIGURAS .....  | 8  |
| 2     | ABREVIACÕES E SÍMBOLOS UTILIZADOS .....  | 9  |
|       | RESUMO .....   | 11 |
|       | ABSTRACT .....   | 12 |
| 3     | INTRODUÇÃO .....   | 13 |
| 3.1   | Baculovírus, uma visão geral .....   | 13 |
| 3.2   | O ciclo infectivo dos baculovirus e o curioso fenótipo duplo de infecção ..... | 15 |
| 3.3   | A importância da regulação gênica .....  | 22 |
| 3.4   | A múltipla oclusão de capsídeos em ODVs .....                                  | 23 |
| 3.5   | Por que baculovirus desenvolveram o fenótipo MNPV? .....                       | 24 |
| 3.6   | Baculovirus é um importante modelo de estudo .....                             | 26 |
| 3.7   | Justificativa .....  | 27 |
| 3.8   | Objetivos .....  | 28 |
| 3.8.1 | Objetivo geral: .....  | 28 |
| 3.8.2 | Objetivos específicos: .....   | 28 |
| 4     | ARTIGO CIENTÍFICO .....  | 29 |
|       | ABSTRACT .....   | 31 |
|       | INTRODUCTION .....   | 32 |
|       | MATERIAL AND METHODS .....   | 33 |
|       | RESULTS .....  | 39 |
|       | DISCUSSION .....   | 47 |
|       | Supplementary Figures .....  | 49 |
| 5     | DISCUSSÃO .....  | 59 |
| 6     | BIBLIOGRAFIA .....   | 76 |

# 1 ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUÇÃO

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Árvore filogenética dos baculovirus. . . . .                                       | 15 |
| Figura 2. Representação esquemática dos dois fenótipos infectivos de baculovirus.. ...       | 16 |
| Figura 3. Análise estrutural de células de inseto infectadas por um baculovírus.....         | 17 |
| Figura 4. Representação esquemática da infecção primária por baculovirus.....                | 18 |
| Figura 5. Esquema representativo das etapas de infecção de uma célula mediada por um BV..... | 21 |
| Figura 6. Fenótipos de oclusão de ODVs em <i>Alphabaculovirus</i> .....                      | 23 |

## ARTIGO CIENTÍFICO

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Baculovirus phylogeny and trait correlation.....                    | 40 |
| Figure 2. <i>p94</i> phylogeny, genomic context and virus constructions ..... | 41 |
| Figure 3. Imunoanalysis of <i>p94</i> expression.....                         | 42 |
| Figure 4. Time course analysis of BV production and DNA replication.....      | 43 |
| Figure 5. OB production, growth competition assay and bioassay.....           | 44 |
| Figure 6. Transmission electron microscopy analysis.....                      | 46 |
| Figure S1. Genome comparison of BomaNPV-S2 vs AcMNPV and BmNPV-T3.....        | 49 |
| Figure S2. The distribution of the number of nucleocapsids per ODV.....       | 50 |



## 2 ABREVIACÕES E SÍMBOLOS UTILIZADOS

|         |   |
|---------|---|
| Ac134   | gene do vírus AcMNPV que codifica a proteína P94              |
| AcMNPV  | Autographa californica Multipliconucleopolyhedrovirus         |
| Bm-5    | linhagem celular de Bombyx mori                               |
| BmNPV   | Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus                              |
| BomaNPV | Bombyx mandarina Nucleopolyhedrovirus                         |
| BV      | do inglês, budded virus (vírus brotado)                       |
| C       | Citosina  |
| DNA     | do inglês, deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)  |
| dsDNA   | do inglês, double stranded DNA (DNA fita dupla)               |
| EGT     | gene ecdysteroid UDP-glucosyltransferase                      |
| G       | Guanina   |
| GP64    | Glicoproteína de 64 kDa                                       |
| GV      | Granulovirus  |
| h p.i.  | horas pós infecção  |
| H+      | Cátion de Hidrogênio  |
| HR      | Homologous regions  |
| IAH     | Independent action hypothesis                                 |
| IE1     | gene immediate early 1  |
| IE2     | gene immediate early 2  |
| kDa     | Kilodaltons   |
| MNPV    | Multi Nucleopolyhedrovirus                                    |
| mRNA    | RNA mensageiro  |
| N       | núcleo  |
| NPV     | Nucleopolihedrovirus  |
| OB      | do inglês, occlusion bodies (corpos de oclusão)               |
| ODV     | do inglês, Occluded derived virus (Vírus derivado de oclusão) |

|        |   |
|--------|---|
| OpMNPV | Orgyia pseudotsugata Multiplenucleopolyhedrovirus |
| OpSNPV | Orgyia pseudotsugata Singlenucleopolyhedrovirus   |
| P94    | proteína de 94 kDa                                |
| pH     | potencial Hidrogeniônico                          |
| RE     | Retículo Endoplasmático                           |
| RNA    | do inglês, ribonucleic acid (ácido ribonucleico)  |
| SeMNPV | Spodoptera exigua Multiplenucleopolyhedrovirus    |
| Sf21   | Spodoptera frugiperda 21                          |
| SNPV   | Single Nucleopolyhedrovirus                       |
| Tn5B   | Linhagem celular de Trichoplusia ni               |
| UDP    | Uracil-diphosphate                                |

## RESUMO

Os baculovirus são um grupo de vírus de inseto com genoma grande de DNA fita dupla, cuja infecção primária é desencadeada por um vírion envelopado denominado vírus derivado da oclusão (do inglês: *occlusion derived virus* - ODV) embebido em um corpo de oclusão (do inglês, *occlusion body*- OB) formado por uma matriz proteica cristalina. Cada vírion pode conter um (SNPV) ou mais nucleocapsídeos (MNPV) por envelope, dependendo da espécie viral. A base genética deste fenótipo não foi identificada e há correlação deste fenótipo com a filogenia de baculovirus não foi estabelecida. Contudo, alguns baculovirus intimamente relacionados, como o BmNPV, BomaNPV-S2 e AcMNPV possuem fenótipos discordantes e podem ajudar a identificar possíveis genes responsáveis pelo múltiplo envelopamento. Portanto, nós comparamos os genomas desses vírus e identificamos um único gene presente em BomaNPV e AcMNPV e ausente em BmNPV. Esse gene é a diferença mais significativa entre esses genomas. Para avaliar se esse gene estava relacionado com o fenótipo MNPV nós construímos três baculovirus recombinantes: vAc-*polh-p94-del* (*p94* deletado), vAc-*polh-p94-ha-rep* (*p94* reparado com uma tag -HA) e vAc-*polh* (controle). Nós mostramos que a P94 é detectada a 6 h.p.i no citoplasma de células infectadas com acumulação máxima a 24 h.p.i.. A deleção completa do gene *p94* no genoma do AcMNPV causou um retardo na replicação do DNA, na produção de BV, na expressão de IE1 e, a produção de OBs é diminuída. Entretanto, o fenótipo MNPV não foi alterado. Desta forma, o gene *p94* de AcMNPV não é um gene essencial para replicação e estabelecimento da infecção viral e sua aquisição no genoma do AcMNPV provavelmente proporcionou ao vírus uma vantagem seletiva.

## ABSTRACT

The baculoviruses are a group of insect viruses with large dsDNA genomes, and their primary infection is triggered by rod-shaped enveloped virions (ODV) embedded in a crystalline protein matrix. Each virion may contain single (SNPV) or multiple nucleocapsids (MNPV) within an envelope, depending on the viral species. The genetic basis of this phenotype has not been identified and it does not seem to be correlated with baculovirus phylogeny. However, some closely related baculoviruses, such as BmNPV, BomaNPV and AcMNPV, have discordant phenotypes and may help to identify candidate genes. Therefore, we compared the genome of these viruses and found a unique gene (*p94*) that was present in BomaNPV and AcMNPV and was absent in BmNPV. This gene was the most significant difference among the BmNPV and the BomaNPN and AcMNPV genomes. To analyze whether this gene was related to the MNPV phenotype we constructed three recombinant baculoviruses: vAc-pol-*p94*-del (*p94* disrupted), vAc-pol-*p94*-ha-rep (*p94* repaired with -HA tag) and vAc-pol (control). We found that the P94 was detected at 6 h post-infection (p.i.) in the cytoplasm of infected cells with maximum accumulation at 24 h p.i. The lack of complete *p94* gene (including the exclusion of the origin of DNA replication located there) in the AcMNPV genome resulted in a delay in DNA replication, BV production and IE1 expression. OB production *in vitro* was also decreased. Moreover, the ODV nucleocapsid envelopment was not changed. Therefore, the *p94* gene of AcMNPV is not an essential gene for viral DNA replication and establishment of viral infection. Its acquisition in some baculoviruses genomes might give a selective advantage for the virus.

## 3 INTRODUÇÃO

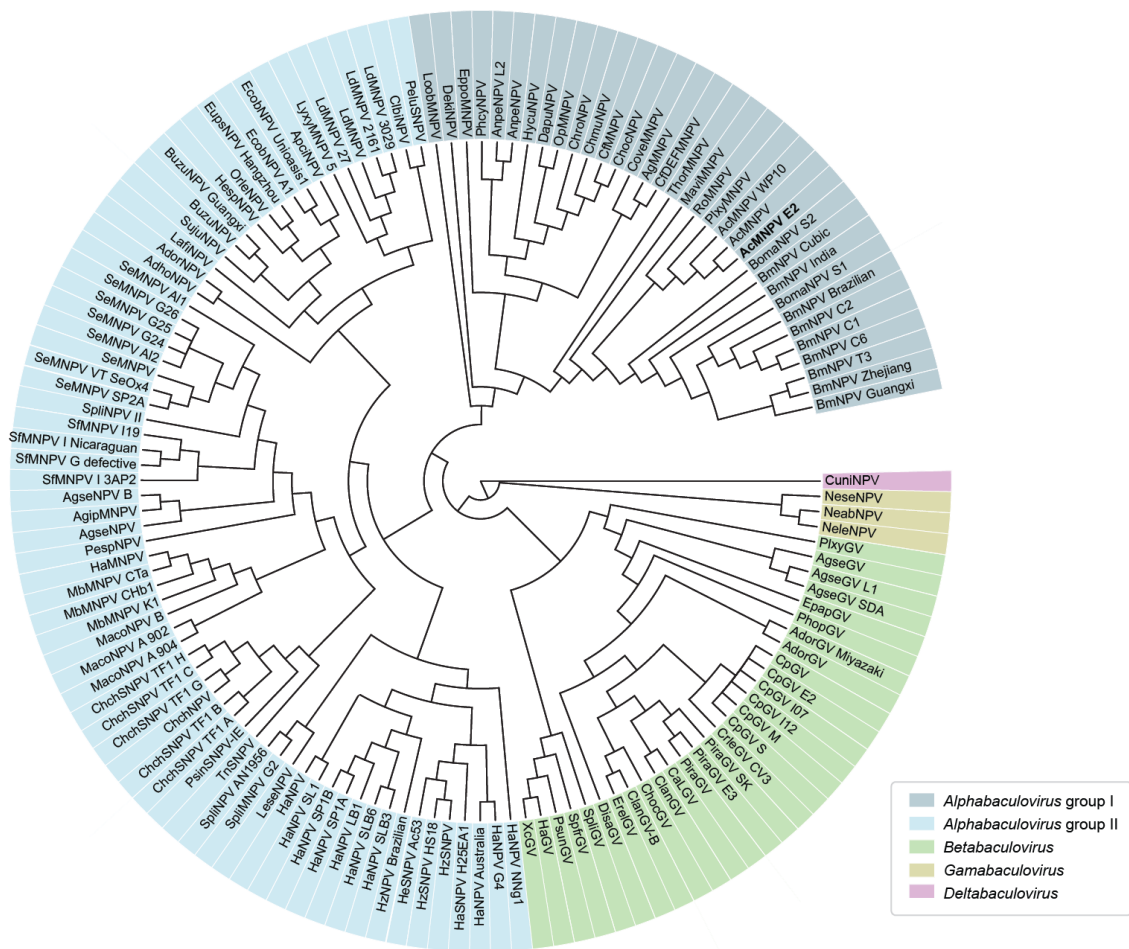
### 3.1 Baculovírus, uma visão geral

*Baculoviridae* é uma família de vírus de DNA fita dupla com tamanho variando entre 80 e 180 pb, que infectam insetos da ordem Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera. O DNA desses vírus apresenta-se empacotado em nucleocapsídeos de 230 a 385 nm de comprimento e 40 a 60 nm de largura em forma de bastão, o que deu origem ao nome “baculovirus” (do latim, *baculum*, que significa bastão) (revisito por Rohrmann, 2013). A família *Baculoviridae* está classificada em quatro gêneros: – *Alphabaculovirus*, nucleopoliedrovirus (NPVs) que infectam insetos da ordem Lepidoptera; – *Betabaculovirus*, granulovirus que infectam Lepidoptera; – *Gamabaculovirus*, NPVs que infectam Hymenoptera; – *Deltabaculovirus*, NPVs que infectam Diptera (Jehle et al., 2006a).

Os baculovirus desempenham um importante papel ecológico regulando o tamanho das populações de insetos (Evans, 1989; Odindo, 1983) e em razão da sua especificidade, esses vírus podem ser empregados com segurança como agentes de controle biológico, uma alternativa a inseticidas químicos (Cory and Bishop, 1997). Baculovirus que infetam *Helicoverpa zea* (Zhang, 1994) e *Lymantria díspar* (Cook et al., 203) são exemplos de vírus aplicados como bioinseticida para controle de pragas na agricultura. No Brasil, o vírus que infecta *Anticarsia gemmatalis* (a lagarta da soja) foi e ainda é largamente utilizado em lavouras de soja (Moscardi, 1999). Enquanto os baculovirus que infectam larvas praga de culturas agrícolas são bem vistos pelos agricultores, os vírus que infectam larvas de *Bombyx mori* (bicho da seda) pode trazer prejuízo para a produção de seda. Com o desenvolvimento da biologia molecular e o advento da tecnologia do DNA recombinante, os baculovirus passaram a ser utilizados

também como vetores de expressão de proteínas heterólogas em células de inseto para os mais diversos fins. Vários métodos de produção de vírus recombinantes foram desenvolvidos e patenteados desde os anos 1980 (Hitchman et al., 2009).

Além disso, os baculovirus podem ser utilizados como um bom modelo para estudo de evolução de vírus de DNA fita dupla (dsDNA, do inglês *double strand DNA*) devido à facilidade de manipulação do seu genoma e um sistema de cultura de células susceptíveis a infecção bem estabelecidos (Zwart et al., 2009).

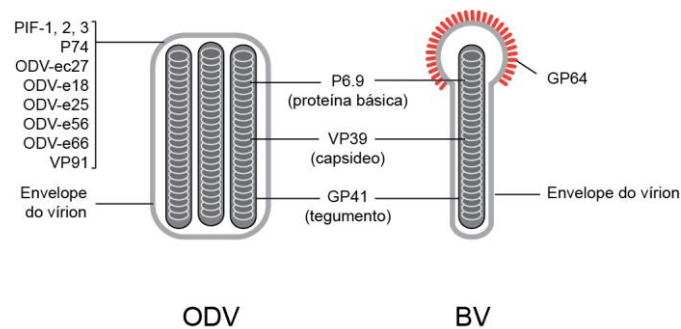


**Figura 1. Árvore filogenética dos baculovirus.** A figura apresenta as espécies com genoma completo sequenciado até o momento e as relações de parentesco entre elas. Note que os quatro gêneros (*Alpha*, *Beta*, *Gama* e *Deltabaculovirus*) estão destacados com cores específicas e são grupos monofiléticos. O grupo *Alphabaculovirus* é dividido em dois grupos (I e II), essa divisão se deve à diferença na proteína de envelope responsável pela entrada do BV na célula, como será visto adiante. O baculovirus *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus (**AcMNPV**), destacado em negrito, é a espécie tipo do gênero *Alphabaculovirus* e é a espécie mais estudada.

### 3.2 O ciclo infectivo dos baculovirus e o curioso fenótipo duplo de infecção

Os baculovirus em geral se apresentam de duas formas infectivas distintas (Figura 2): os vírions derivados de oclusão (ODV, do inglês ‘occlusion-derived virus’) e

os vírions brotados (BV, do inglês ‘budded virion’). Os primeiros são responsáveis pela infecção inicial do inseto nas células epiteliais do intestino médio dos hospedeiros, enquanto que os BVs são responsáveis pela infecção de célula a célula, ocasionando a infecção dos demais tecidos (revisto por Rohrmann, 2013). Aqui, explicarei principalmente aspectos dos baculovirus do tipo NPV (os pertencentes ao gênero *Alphabaculovirus*) que infectam lepidópteras, que são os baculovirus mais bem estudados e que são mais fáceis de cultivar e fazer manipulações genéticas para o estudo de sua biologia molecular.



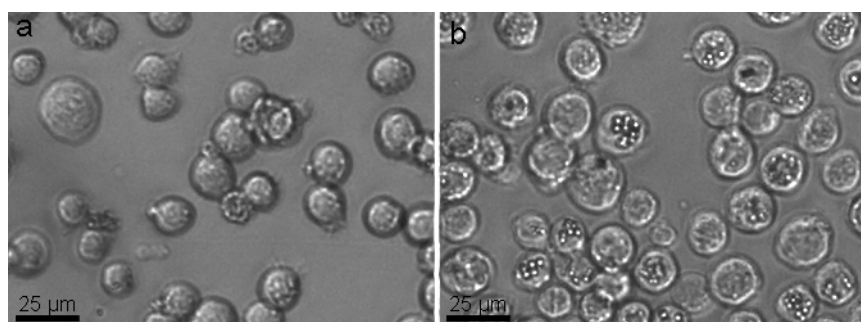
**Figura 2. Representação esquemática dos dois fenótipos infectivos de baculovirus.**

A figura representa o fenótipo viral ODV, responsável pela infecção inicial no intestino do inseto hospedeiro (transmissão horizontal) e o BV, responsável pela infecção secundária nos diferentes tecidos do inseto (transmissão sistêmica). Estão destacadas algumas proteínas que compõe o envelope e o capsídeo de cada um deles. Note que as proteínas do envelope são diferentes, enquanto as proteínas do capsídeo são comuns.

Os ODVs são chamados de vírions derivados de oclusão porque, nas fases finais de infecção dentro das células infectadas, são encontrados ocluídos em uma matriz proteica chamada de corpo de oclusão (OB, do inglês *occlusion body*), também chamado de poliedro nos *Alphabaculovirus*. O OB é constituído, principalmente, por uma proteína chamada poliedrina (POLH), que é largamente produzida em células de inseto nas fases tardias da infecção (Quant et al., 1984). Essa matriz proteica em forma

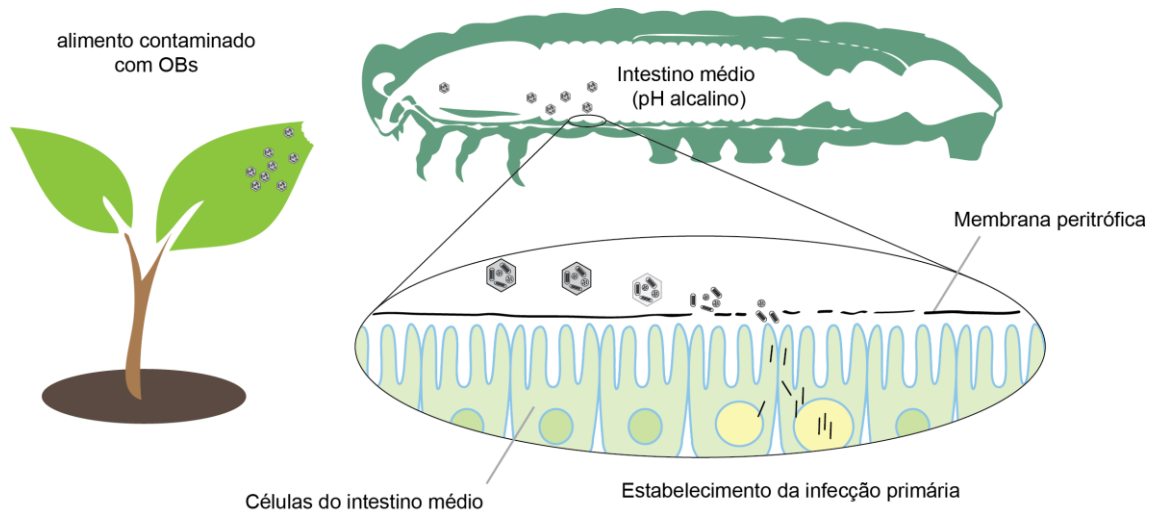


de cristal é capaz de estabilizar o vírus no ambiente por anos e pode ser facilmente observado (Figura 3) em um microscópio de luz comum (Rohrmann, 1986).



**Figura 3. Análise estrutural de células de inseto infectadas por um baculovírus.** Micrografias de luz mostrando células de inseto não infectadas (a) e infectadas (por volta de 72 h p.i.) com o vírus AcMNPV (b). OS pontos cristalinos no núcleo das células são os poliedros ou OBs.

Os OB são ingeridos pelo hospedeiro que comem alimento contaminado e, ao chegarem ao intestino médio do inseto, o pH alcalino faz com que o OB se dissolva liberando os ODVs (Hughes, 1950a). Os ODVs passam pela membrana peritrófica do intestino do inseto, uma membrana composta principalmente por quitina, proteínas e glicoproteínas, que é rompida pelo atrito com o alimento ou por ação de proteínas (metaloproteinases e quitinases) que estão presentes nos OBs de alguns baculovirus e são liberadas junto com o ODV no intestino (Lepore et al., 1996; Li et al., 2003; Peng et al., 1999). Além disso, os ODVs possuem proteínas na sua superfície que também possuem o papel de degradar a membrana peritrófica (Slavicek and Popham, 2005).



**Figura 4. Representação esquemática da infecção primária por baculovirus.** O inseto ingere os OBs junto com a comida. Após chegar ao intestino médio da lagarta, os OBs são dissolvidos no baixo pH liberando os ODVs que atravessaram a membrana peritrófica e entrarão nas células do intestino médio por fusão de membrana, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma. Os nucleocapsídeos vão até o núcleo, onde liberam o material genético do vírus iniciando os processos de transcrição e mais tarde de replicação. Esquema fora da escala natural.

Após atravessar a membrana peritrófica o ODV encontra a superfície das células colunares do epitélio do intestino, onde entra na célula por meio de fusão direta de membrana (Keddie et al., 1989). Isso só é possível graças a proteínas no envelope do ODV que interagem com proteínas da membrana celular e medeiam a fusão do envelope viral com a membrana celular (Kikhno et al., 2002). Com a fusão, o capsídeo é liberado dentro do citoplasma, o nucleocapsídeo é transportado até o núcleo por processos que envolvem polimerização de actina e atravessam o poro nuclear, como revisto por (Au et al., 2013). Já dentro do núcleo, o nucleocapsídeo libera o DNA viral, que é utilizado primeiro para a transcrição e depois para replicação. O estroma virogênico é uma região de intensa transcrição e replicação do DNA, é constituído principalmente por RNA, algumas proteínas e DNA nas bordas, onde ocorre montagem dos vírions (Young et al., 1993). Conforme os mRNAs são sintetizados, eles são

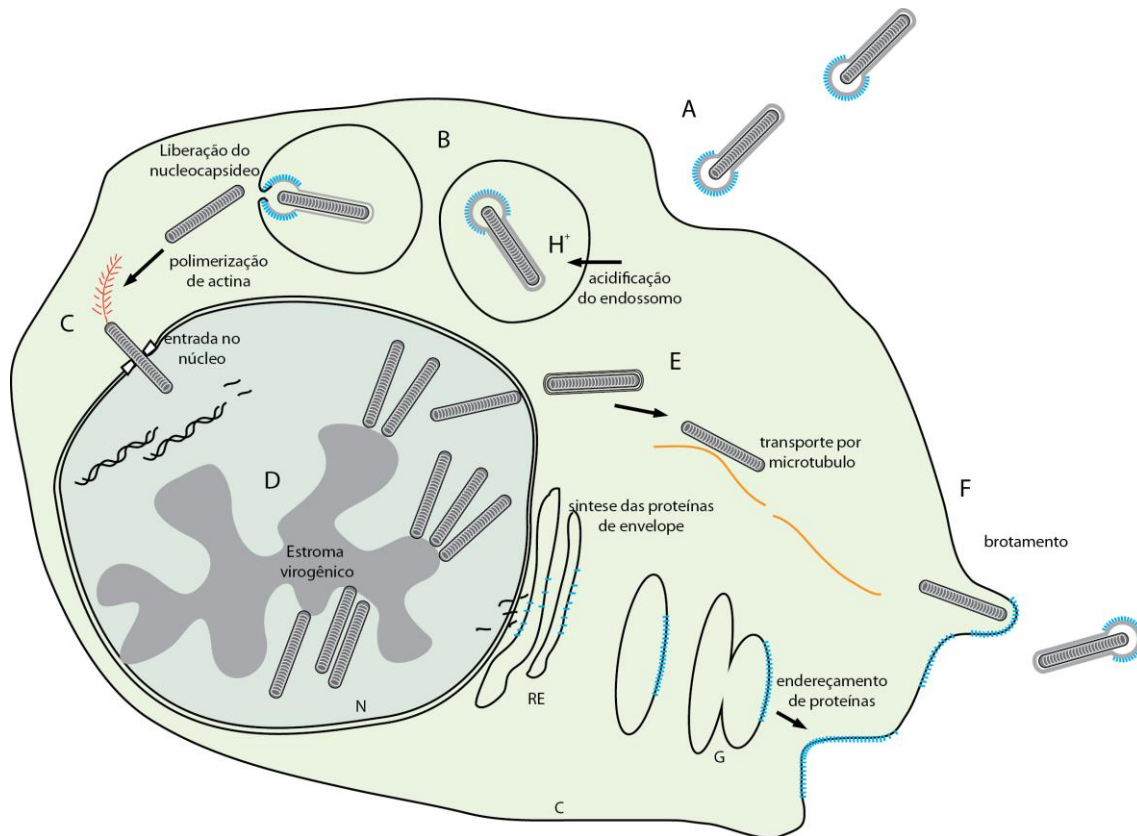
enviados para o citoplasma onde as proteínas virais serão produzidas e endereçadas para regiões próprias, por exemplo, proteínas que fazem parte do envelope dos BVs serão endereçadas para a membrana celular, as proteínas envolvidas na montagem do capsídeo serão endereçadas para o núcleo.

A replicação do DNA viral só começa quando as proteínas necessárias para tal evento como DNA polimerase, helicase, e primase, ambas codificadas pelo próprio vírus, já foram produzidas e estão no núcleo. A replicação inicia-se, então, em regiões homólogas ou HR (do inglês, *homologous regions*) e, após o DNA ser replicado ele é encapsidado em novos nucleocapsídeos, que saem do núcleo adquirindo parte da membrana nuclear como envelope, este envelope é perdido mais tarde durante a migração para a porção basal das células colunares epiteliais do intestino médio (Granados and Lawler, 1981). Nessa porção da membrana estão presentes proteínas virais que fazem parte do envelope do BV e serão importantes para a entrada deste em uma nova célula, espalhando assim a infecção pelos demais tecidos do inseto (Keddie et al., 1989). O nucleocapsídeo então brota dessa membrana, adquirindo parte dela como envelope.

As proteínas de envelope responsáveis de fusão dos BVs de baculovirus do gênero *Alphabaculovirus* são a proteína F e/ou a proteína GP64. Os membros do grupo I possuem ambas, e a GP64 é a responsável pela entrada do BV (Blissard and Rohrmann, 1989), enquanto que os membros do grupo II possuem apenas a proteína F, que é a responsável pela entrada do BV (Pearson et al., 2000). A distribuição de GP64 na membrana de células epiteliais do intestino médio de *Trichoplusia ni* se dá na porção basal. Essa distribuição polar de GP64 garante que os BVs brotem apenas para o lado voltado para a lâmina basal e não para o lúmen do intestino e não é observada em outras células de outros tecidos (Keddie et al., 1989).

Para chegar aos demais tecidos o vírus precisa atravessar a lâmina basal, uma estrutura composta principalmente por glicoproteínas que atua como uma barreira contra infecções. Foi mostrado para alguns insetos que as células da traqueia atravessam a lâmina basal em alguns pontos, e é possível que os BVs utilizem essas projeções para iniciar o espalhamento sistêmico (Engelhard et al., 1994). Além disso, alguns baculovirus codificam proteínas que degradam a lamina basal, o que permite que os BVs a atravessem chegando à hemolinfa (Detvisitsakun et al., 2005; Means and Passarelli, 2010).

Proteínas presentes no envelope dos BVs (como a proteína F, por exemplo) interagem com receptores de membrana das células de outros tecidos. A entrada na célula se dá por endocitose mediada por receptor e envolvendo a proteína celular clatrina (Long et al., 2006). É formada, então, uma vesícula intracelular chamada de endossomo. Em sequência, o ambiente interno do endossomo é acidificado, o que causa uma alteração conformacional em proteínas do envelope do BV que medeiam à fusão da membrana do BV com a do endossomo, liberando assim o nucleocapsídeo que pode então migrar para o núcleo e dar início à replicação viral (Monsma et al., 1996). Parte dos nucleocapsídeos formados no núcleo das células infectadas permanece no núcleo, onde adquirem um envelope derivado da membrana nuclear (Shi et al., 2015). Esses nucleocapsídeos envelopados no núcleo são os ODVs, que serão oclusos nos OBs. Com a morte do inseto, após alguns dias de infecção estes OBs serão liberados no meio ambiente, podendo contaminar um novo hospedeiro e assim reiniciar o ciclo infectivo.



**Figura 5. Esquema representativo das etapas de infecção de uma célula mediada por um BV.** A. Receptores presentes na membrana da célula são reconhecidos pelas proteínas do envelope viral (proteína F ou GP64) e o BV entra na célula por endocitose. B. Acidificação do endossomo que proporciona a fusão da membrana do BV com a do endossomo liberando o nucleocapsídeo (NC). C. O NC é transportado por meio de polimerização de filamentos de actina até o núcleo, onde ele atravessa o poro nuclear e então libera o material genético. D. São iniciados os processos de transcrição, o estroma virogênico é formado, a replicação é iniciada e novos nucleocapsídeos são montados. Os mRNAs migram para o citoplasma onde é feita a síntese proteica, que são então endereçadas para os locais onde devem desempenhar as suas funções, por exemplo as proteínas de membrana vão até a periferia celular passando pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi. E. O NC brota do núcleo levando a membrana nuclear como envelope, este envelope é perdido em seguida e o NC migra até a membrana celular por meio de transporte mediado por microtúbulos. F. o NC brota, levando consigo parte da membrana e as proteínas de envelope ali presentes. O BV recém-brotado pode então infectar uma nova célula e dar continuidade ao ciclo.

### 3.3 A importância da regulação gênica

A expressão dos genes de baculovirus é temporalmente regulada e seus genes podem ser classificados de acordo com o tempo em que são expressos em genes precoce, tardios e muito tardios (do inglês, *early*, *late*, e *very late*). Os genes da fase precoce são transcritos pela RNA polimerase do próprio hospedeiro e possuem regiões promotoras a montante à região codificadora que são reconhecidas por fatores de transcrição celulares, revisto por (Rohrmann, 2013a).

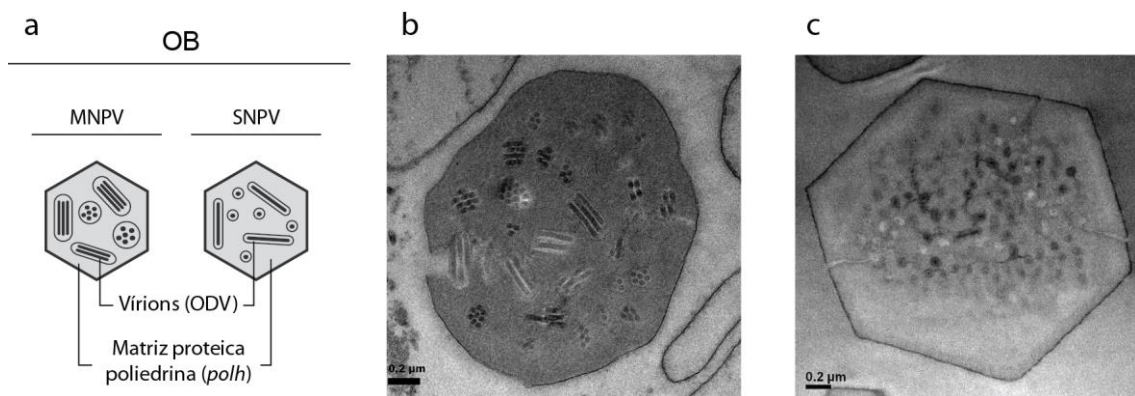
Os genes da fase precoce são genes responsáveis por iniciar o processo de replicação viral, como por exemplo, o gene *ie1* (do inglês, '*immediate early 1*'), que é um transativador de genes da fase precoce, isto é, atua na ativação da transcrição destes genes e é expresso assim que a infecção se inicia (Choi and Guarino, 1995; Nagamine et al., 2015). Outro exemplo é o gene *ie2* (do inglês, '*immediate early 2*'), que também atua como transativador (Imai et al., 2000). Outros genes dessa fase inicial são os relacionados à replicação do DNA, como a DNA polimerase, a helicase e a primase (Chen et al., 2013).

Já os genes da fase tardia e muito tardia são transcritos pela RNA polimerase viral. As sequencias promotoras de genes dessa fase possuem alguns padrões, como por exemplo, a presença do sinal TAAG (Yang and Miller, 1999), que é reconhecido pelos fatores de transcrição viral. O gene que codifica para a poliedrina, e P10, proteína que forma estruturas fibrilares e está envolvida no processo de oclusão viral, são exemplos de genes de fase tardia e muito tardia (Possee and Howard, 1987). Genes envolvidos na formação dos capsídeos e dos ODVs também são genes dessa fase. A replicação do DNA marca o início da fase tardia e ocorre por volta das 12 h pós-infecção (p.i). A utilização de fatores de transcrição e de uma RNA polimerase próprios é importante

para os baculovirus porque um dos efeitos da sua infecção é o desligamento da expressão gênica do hospedeiro (Nobiron et al., 2003).

### 3.4 A múltipla oclusão de capsídeos em ODVs

Os vírus do gênero *Alphabaculovirus* possuem ODVs que podem ser envelopados sozinhos, isto é, apenas um capsídeo por envelope (*single nucleopolyhedrovirus*, SNPV), ou de maneira agrupada, isto é, vários capsídeos por envelope (*multiple nucleopolyhedrovirus*, MNPV) (Hughes and Addison, 1970) (Figura 6).



**Figura 6. Fenótipos de oclusão de ODVs em *Alphabaculovirus*.** a) representação esquemática da diferença entre os fenótipos MNPV e SNPV. Note que em MNPVs existem mais de um nucleocapsídeo por envelope, enquanto nos SNPVs há apenas um. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de um poliedro MNPV (b) (AcMNPV) e de um poliedro SNPV (c) (BmNVP).

Essa diferença fenotípica é amplamente observada e foi, por muito tempo, utilizada na classificação e nomenclatura de baculovírus onde os vírus recebiam o nome da espécie hospedeira em que foi identificado seguido do nome do fenótipo observado: *multiple* ou *single nucleopolyhedrovirus*. Por exemplo, o baculovírus caracterizado

infectando larvas da espécie *Autographa californica*, recebeu o nome de *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) (Ayres et al., 1994).

Um exemplo de inseto que é acometido tanto por infecções de baculovírus MNPV como SNPV é a lagarta *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae). Esta espécie pode ser infectada por OpMNPV e/ou OpSNPV (Hughes and Addison, 1970). Esses dois vírus foram estudados por diversos pesquisadores que mostraram que (i) a quantidade de capsídeo por poliedro é maior em OpMNPV, (ii) que o conteúdo G+C desses vírus é diferente, e (iii) que insetos alimentados com diferentes quantidades de OpMNPV e OpSNPV mostram em sua maioria uma progênie viral OpMNPV e uma pequena porção restante composta de uma mistura dos dois vírus. Entretanto, essas diferenças observadas não podem ser atribuídas apenas à diferença de fenótipo MNPV x SNPV, afinal os genomas desses vírus são bastante diferentes entre si e eles pertencem a grupos filogeneticamente distantes dentro do gênero *Alphabaculovirus* (Ahrens et al., 1997a; Jakubowska et al., 2007). É importante ressaltar que os baculovirus, sejam eles MNPVs ou SNPVs, passam por uma fase *single*, que é a do fenótipo BV. Até o momento só foram observados BVs com apenas um nucleocapsídeo por envelope (Rohrmann, 2014a).

### 3.5 Por que baculovirus desenvolveram o fenótipo MNPV?

Duas hipóteses explicam uma possível vantagem dos vírus MNPVs, são elas: (i) a presença de mais de um capsídeo por envelope pode proporcionar a recuperação de genomas defectivos por meio de recombinação e/ou complementação; (ii) a entrada de mais de um capsídeo na célula simultaneamente pode permitir que alguns entrem no núcleo e iniciem a infecção enquanto outros atravessem a célula e brotem do outro lado



(na forma de BV) permitindo um espalhamento mais rápido da infecção (Rohrmann, 2014a).

De fato a recombinação entre genomas de baculovirus é um fenômeno frequente e bem documentado (Muñoz et al., 1997) (Hajós et al., 2000). Um dos fatores que influenciam a frequência destes eventos é a multiplicidade de infecção, isto é, em alta multiplicidade de infecção a probabilidade de coinfecção é maior facilitando assim a ocorrência de eventos de recombinação (Kamita et al., 2003). Além disso, a complementação genômica também é um mecanismo que ocorre em baculovirus e que permite a permanência de genomas defectivos na população (Simón et al., 2004). Embora os genomas defectivos possuam deleções e muitas vezes não são capazes de replicarem sozinhos, isto é, dependem do genoma parental, foi mostrado que as misturas genotípicas entre parental e defectivo possuem maior fitness que os genótipos isolados (López-Ferber et al., 2003). Considerando a coinfecção é mais provável em MNPVs (uma vez que vários capsídeos entram na célula) é razoável imaginar que estes dois mecanismos descritos acima possam ocorrer com maior frequência, afetando a forma com que estes vírus evoluem. Entretanto, tal relação ainda não foi mostrada e experimentos evolutivos que comparem MNPVs com SNPVs com mínima diferença genética são necessários.

No que diz respeito à segunda hipótese, Washburn e colaboradores propuseram que MNPVs são mais rápidos em estabelecer infecção sistêmica e, conseqüentemente, mais eficientes em superar o efeito de descamação do intestino, um mecanismo que confere proteção à lagarta, do que SNPVs (Washburn et al., 1999a). Em AcMNPV os ODVs que possuem mais de um nucleocapsídeo por envelope são mais frequentes, entretanto ODVs com apenas um nucleocapsídeo também são produzidos, embora em menor proporção. O número de nucleocapsídeos por envelope altera a densidade do

ODV e é possível separá-los por gradiente de sacarose. Washburn e colaboradores usaram tal metodologia e obtiveram inóculos enriquecidos em ODVs *single* e ODVs *multiple*, ambos a partir de OBs de um mesmo isolado de AcMNPV. Usando estes inóculos em experimentos *in vivo*, eles corroboraram a ideia apresentada acima a respeito de uma vantagem dos MNPVs no que diz respeito à resistência a escamação (Washburn et al., 1999a). Outro trabalho analisou vírus de genótipos diferentes, o AcMNPV e o Helicoverpa zea SNPV (HzSNPV) e também observou que o vírus MNPV consegue estabelecer infecção sistêmica com maior rapidez (Washburn et al., 2003). O problema da primeira abordagem é que os genomas de ambos os inóculos são absolutamente iguais de maneira que a progênie viral de ambos terá a mesma frequência de nucleocapsídeos por ODV, o que impossibilita a sua utilização em experimentos de evolução com sucessivas passagens. Já o segundo trabalho utiliza vírus com genomas muito diferentes e outros fatores podem ter causado as diferenças observadas e também inviabilizam a utilização deste para experimentos evolutivos. Dessa forma, para testar de fato essa segunda hipótese vírus SNPVs e MNPVs com genomas muito parecidos seriam úteis para melhorar a compreensão do impacto do fenótipo MNPV na biologia e na evolução de baculovirus.

### 3.6 Baculovirus é um importante modelo de estudo

Com a possibilidade de sequenciamento de genomas completos e com os avanços das técnicas de identificação de genótipos, os estudos de evolução de vírus utilizando baculovirus se tornaram mais frequentes, de modo que, os baculovirus representam hoje um importante modelo para estudo de evolução de vírus com genoma grande de DNA dupla fita (Herniou and Jehle, 2007). O possível uso de baculovirus como modelo de estudo de evolução viral é favorecido pelo fato de possuírem várias

espécies com genoma completo sequenciado, uma grande gama de espécies hospedeiras, certo grau de especificidade e por possuírem um sistema bem estabelecido que permite alterar o genoma viral (*e.g.* introduzindo ou deletando um gene, por exemplo). Como foi visto a multiplicidade de infecção tem impacto para a evolução do vírus. Por muito tempo os modelos de evolução diziam que alta multiplicidade de infecção aumentaria a virulência, entretanto, estudos recentes mostram que dependendo do mecanismo, a alta multiplicidade de infecção pode, na verdade, selecionar para a redução da virulência, isto é, patógenos em alta multiplicidade de infecção ficariam individualmente menos virulentos (Brown et al., 2002). As diferenças entre baculovirus de fenótipo MNPV e SNPV podem fornecer ideias a respeito deste aspecto. Dessa maneira, investigar a base genética por trás dos fenótipos MNPV e SNPV pode ajudar no esclarecimento dessas questões.

### 3.7 Justificativa

O desenvolvimento do trabalho proposto tem relevância para o estudo de evolução de baculovirus e vírus de genoma grande de DNA fita dupla. Poderá fornecer informações importantes a respeito da base genética por trás do fenótipo MNPV, além de caracterizar pela primeira vez um dos genes que ainda não é sabido a sua função, o gene *Ac134* (P94).

A hipótese científica deste trabalho é de que existe correlação filogenética entre o fenótipo MNPV e a filogenia de baculovirus e que a comparação de genomas próximos com fenótipos diferentes poderá revelar genes importantes para o entendimento da base genética por trás deste fenótipo, como por exemplo o gene *p94* do AcMNPV.

### 3.8 Objetivos

#### 3.8.1 Objetivo geral:

Mapear o fenótipo MNPV e SNPV na filogenia de baculovirus para identificar possíveis diferenças genéticas que explicariam tais fenótipos.

#### 3.8.2 Objetivos específicos:

- Avaliar se há correlação filogenética entre os fenótipos citados e a filogenia de baculovirus.
- Identificar grupos monofiléticos com fenótipos diferentes e comparar o genoma desses grupos buscando possíveis diferenças genéticas entre SNPVs e MNPVs que explicariam a diferença destes fenótipos.
- Construir vírus recombinantes com deleção do gene *p94* para avaliar o impacto biológico dessas diferenças genéticas *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar por microscopia eletrônica o efeito da deleção do gene *p94* no fenótipo MNPV.

## 4 ARTIGO CIENTÍFICO

O desenvolvimento do trabalho proposto no projeto de mestrado que deu origem a essa dissertação permitiu a elaboração de um artigo científico a ser submetido à revista Scientific Reports. O texto a seguir é o manuscrito a ser submetido.

Impact of the *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus p94 (ac134)* loci during  
baculovirus *in vitro* and *in vivo* infection

Miguel de Sousa Andrade<sup>1</sup>, Daniel M. P. Ardisson-Araújo<sup>1</sup>, Daniel R. Sosa-Gomez<sup>2</sup>, Bergmann Morais  
Ribeiro<sup>1</sup>, Fernando Lucas de Melo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Baculovirus, Cell Biology Department, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil;

<sup>2</sup>Embrapa Soja, Londrina, PR, Brazil.

\*Corresponding author:

Dr. Fernando Lucas de Melo

Laboratory of Baculovirus

Cell Biology Department

University of Brasilia

Brasilia, DF, 70910-900

tel: 55-61-31070478

e-mail: [flucasmelo@gmail.com](mailto:flucasmelo@gmail.com)

## ABSTRACT

The baculoviruses are a group of insect viruses with large dsDNA genomes, and their primary infection is triggered by rod-shaped enveloped virions (ODV) embedded in a crystalline protein matrix. Each virion may contain single (SNPV) or multiple nucleocapsids (MNPV) within an envelope, depending on the viral species. The genetic basis of this phenotype has not been identified and it does not seem to be correlated with baculovirus phylogeny. However, some closely related baculoviruses, such as BmNPV, BomaNPV and AcMNPV, have discordant phenotypes and may help to identify candidate genes. Therefore, we compared the genome of these viruses and found a unique gene (*p94*) that was present in BomaNPV and AcMNPV and was absent in BmNPV. This gene was the most significant difference among the BmNPV and the BomaNPV and AcMNPV genomes. To analyze whether this gene was related to the MNPV phenotype we constructed three recombinant baculoviruses: vAc-pol-*p94*-del (*p94* disrupted), vAc-pol-*p94*-ha-rep (*p94* repaired with -HA tag) and vAc-pol (control). We found that the P94 was detected at 6 h post-infection (p.i.) in the cytoplasm of infected cells with maximum accumulation at 24 h p.i. The lack of complete *p94* gene in the AcMNPV genome resulted in a delay in DNA replication, BV production and IE1 expression. OB production *in vitro* was also decreased. Moreover, the ODV nucleocapsid envelopment was not changed. Therefore, the *p94* gene of AcMNPV is not an essential gene for viral DNA replication and establishment of viral infection. Its acquisition in some baculovirus genomes might give a selective advantage for the virus.

## INTRODUCTION

The *Baculoviridae* is a family of insect dsDNA viruses, which is currently divided into four genera: *Alpha-*, *Beta-* (both lepidopteran-specific), *Gama-* (hymenopteran-specific), and *Deltabaculovirus* (dipteran-specific) (Jehle et al., 2006b). During the late stages of infection, all baculoviruses produce occlusion bodies (OB) that contain rod-shaped enveloped virions embedded within a crystalline protein matrix (Ji et al., 2010). After ingestion by the insect larvae, OBs are dissolved by the midgut alkaline gastric juice releasing occlusion-derived viruses (ODVs) (Hughes, 1950b). ODVs carry the nucleocapsids and are responsible for the inter-host virus infection. Following the entry into midgut epithelial cells, ODVs head for the cell nucleus where virus replication takes place. Afterwards, a second virus phenotype is produced, the budded virus (BV), that leaves the cell nucleus and buds off from the cellular membrane. BVs are responsible for the intra-host virus infection. Both ODVs and BVs present a different envelope protein composition, but harbor a similar nucleocapsid (Rohrmann, 2013b).

Depending on the virus species, ODVs may contain one (single phenotype, SNPV) or more nucleocapsids (multiple phenotype, MNPV) per envelope. Although the variation on this phenotype is well documented in baculoviruses, the evolutionary advantage of being a MNPV rather than SNPV remains to be determined. Two hypotheses have been proposed (Rohrmann, 2014b). In the first, the genome complementation hypothesis, the entry of several genome copies in a single cell allows the maintenance of defective genomes, influencing on viral population dynamics (Clavijo et al., 2009). In the second, the pass-through hypothesis, multiple nucleocapsids enter one single cell and many of these nucleocapsids may cross the cell cytoplasm and bud toward the hemolymph, accelerating the onset of virus systemic infection (Washburn et al., 1999b). Although both explanations may coexist, two reports supports the second hypothesis: (1) MNPVs was found to present a greater chance to establish infection in midgut epithelial cells than SNPV due to cell sloughing that can eliminate SNPVs (Washburn et al., 2003); and (2) MNPV-enriched ODV inocula



of the same baculovirus species was found to be faster in establishing the secondary infection of tracheal cells than the SNPVs fraction (Washburn et al., 1999b).

The ODV morphogenesis is a complex process and most steps have not been elucidated. Electron microscopic studies have suggested that during ODV morphogenesis AcMNPV multiple nucleocapsids are often aligned with nuclear-derived membranes, favoring the formation of MNPV virions (Shi et al., 2015). However, the molecular mechanism underlying nucleocapsid envelopment is still unclear. For instance, some genes when disrupted (Ac23 (Yu et al., 2009), Ac43 (Tao et al., 2013), Ac92 (Wu and Passarelli, 2010)) or even mutated (*dnapol* (Feng et al., 2012)) alter the nucleocapsid envelopment, increasing the number of singly enveloped ODVs. Moreover, the *Bombyx mandarina* nucleopolyhedrovirus Strain 2 (BomaNPV-S2) presents SNPV morphotype when infecting *Bombyx mori* cells and MNPV morphotype when infecting *Trichoplusia ni* cells (Xu et al., 2012), suggesting that host cell physiology is also a factor of importance.

In this study, we used comparative phylogenetic and genomic approaches to identify potential genes related to ODV nucleocapsid envelopment. One group of closely related genomes (AcMNPV, BomaMNPV and BmNPV) with contrasting morphotypes was identified. The genomic comparison of this three related species revealed that only one gene (*p94*) was present in both AcMNPV and BomaMNPV but absent in BmNPV. In order to investigate the biological impacts of this gene, a fully *p94* deleted AcMNPV recombinant virus was constructed and used to infect insect cells and larvae.

## MATERIAL AND METHODS

**Sequence data, phylogenetic reconstructions and genome comparison.** To determine the virus morphotype (*i.e.* MNPV or SNPV) of all completely sequenced baculovirus genomes, we carried out an extensive literature review (Table S1). The resulting data were subjected to a phylogeny-trait association test implemented in BaTS (Bayesian Tip-Significance testing) (Parker et

al., 2008). The clades with contrasting phenotypes were selected for genome comparison. The selected genomes were compared using CGView Comparison Tool (Grant et al., 2012) and the results were plotted using CIRCOS (Krzywinski et al., 2009). To investigate the phylogenetic relationship of *ac134* (*p94*) we performed BLAST analyses (Altschul et al., 1990) (Blast-p, Blast-n and PSI-Blast) to identify and collect orthologs sequences. A maximum likelihood tree was inferred using the MAFFT alignment (Katoch et al., 2002) and the Fast-tree methods (Liu et al., 2011) with a Shimodaira-Hasegawa-like (Anisimova et al., 2011) test for branch support implemented in Geneious 7.1 (Kearse et al., 2012). For the baculovirus phylogeny, a maximum likelihood tree was inferred using the 37 baculoviral core proteins of all baculovirus genomes publicly available (Table S1). Alignments and trees are available upon request.

**Plasmids and Cells.** Bacmid bMON14272 (Invitrogen) containing the AcMNPV genome (hereafter, vAc) was propagated in *Escherichia coli* BJ5183 as previously described (Takahashi et al., 2003). DH10B cells with the helper plasmid pMON7124 were purchased from Invitrogen. *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Tn5B) cells (Saarinen et al., 1999) and *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21 (Sf21) cells (Vaughn et al., 1977) were maintained at 27° C in TC-100 media supplemented with 10% of fetal bovine serum, penicillin G (60 µg/ml), streptomycin sulfate (200 µg/ml), and amphotericin B (0.5 µg/ml).

**Construction of the *p94* knockout backbone bacmid.** The *p94* knockout bacmid was generated through homologous recombination in *E. coli* as previously described (Wu et al., 2006). The gene was replaced with the chloramphenicol resistance gene (*Cm*(R)). A 1,178-bp PCR fragment was amplified using pCMR (Whitby et al., 1998) as the template and primers *p94*-D1 and *p94*-D2 (Table 1). The resulting fragment contained the *Cm*(R) cassette and 70 bp of *p94* flanking regions at each end. Purified PCR fragments (1 µg) were electroporated into electrocompetent BJ5183 cells, and colonies resistant to chloramphenicol and kanamycin were selected for further confirmation by PCR analysis to generate the vAc-*p94*-del bacmid. The knockout bacmid was

isolated and electroporated into DH10B cells containing only the helper plasmid pMON7124. Colonies that grew on Luria-Bertani (LB) agar plates containing 20 µg/ml chloramphenicol, 50 µg/ml kanamycin, and 10 µg/ml tetracycline were selected, and the vAc-*p94*-del bacmid was isolated and confirmed by PCR.

**Table 1.** Primer sequences used in this study.

| Primer name     | Sequence   |
|-----------------|--|
| GP41-F          | CGTAGTGGTAGTAATCGCCGC  |
| GP41-R          | AGTCGAGTCGCGTCGCTTT  |
| Cm-qPCR-F       | GAAAGACGGTGAGCTGGTGA   |
| Cm-qPCR-R       | TAACACGCCACATCTTGCGA   |
| <i>p94</i> -D1  | CGAACTGCCGCAGCTTTTCCTTTCCAAAATGTTGATTGTCGT<br>GTTTAAAAGCAACGTTGAAATTTCCGAGCAGCCCTTTCGTC<br>TTCGAATAAATACCTG  |
| <i>p94</i> -D2  | GCCAGAGATAACACACACACGATCACTCATGTTACAGAACG<br>TGACCGCTCCGCTCGTGTATATAAAAATCAGCTTTAAACCAG<br>CAATAGACATAAGCGGC |
| ppol F          | GCGGCCGCGAATTCGGGCCCGCTAGCGTACGCAGCTTCTTCT<br>AGTTCAATTAC  |
| ppol R          | ACTAGTTTTATTACAAAACAAAACACAAACGAATATCGACAA<br>AGC  |
| NotI-Ac134-P-F  | CTAGCGGCCGCCACTTAATACAAGCAACGTTG   |
| PstI-Ac134-Ha-R | CTGCAGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTTACG<br>ACAAATATTGACTCGTTG   |

### Construction of the *p94* knockout, repair, and AcMNPV bacmid with the *polyhedrin*

(*polh*) gene. The bacmids vAc and vAc-*p94*-del were electroporated into DH10B cells containing the helper plasmid pMON7124. To generate a donor plasmid harboring the *polh* gene, we amplified the cassette containing all promoter, coding region, and terminator (ppol-pA) from the AcMNPV genome using specific primers (ppol-F and ppol-R) and cloned it into the plasmid pFastBac1/AccI (Ardisson-Araújo et al., 2013) at the SpeI/NotI sites to generate the plasmid pFB1/A-ppolpA. This *polh* cassette was inserted into the *polh* locus by site-specific transposition toward both the vAc and vAc-*p94*-del as previously described (Ardisson-Araújo et al., 2013) to generate vAc-*polh* and vAc-*polh-p94*-del. To construct the repaired virus vAc-*polh-p94*-ha-rep, a donor plasmid was engineered by amplifying the *p94* cassette (promoter/coding region) from the AcMNPV genome using specific

primers (NotI-Ac134-P-F and PstI-Ac134-Ha-R) and cloning it into the pFB1/A-ppolpA at the NotI/PstI cloning site. The gene was amplified adding a *hemagglutinin* (*ha*) tag at the c-terminal region. The resulting plasmid, pFB1/A-ppolpA-*p94-ha* was used in a site-specific transposition toward *vAc-p94-del*. One microgram of each recombinant bacmid (*i.e.* *vAc-polh*, *vAc-polh-p94-del*, and *vAc-polh-p94-ha-rep*) was transfected into Tn5B cells ( $10^6$ ) using liposomes (Cellfectin® - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The supernatant from seven days post-transfection containing the recombinant viruses were collected, amplified in the same insect cells, and tittered as previously described (O'Reilly et al., 1994).

**Immunofluorescence.** Sf21 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded on coverslips in 35-mm-diameter culture dishes and infected at MOI for 10 with the recombinant viruses. At several hours post-infection, the supernatant was removed and the cells were washed twice with PBS, pH 6.2, and fixed in 2.5% formaldehyde in PBS for 10 min at room temperature (RT). The fixed cells were washed three times in PBS for 5 min, followed by permeabilization in 0.1% NP-40 (Sigma) in PBS for 10 min at RT. Cells were washed three times in PBS for 5 min per wash before incubation with blocking solution (5% BSA, 0.3% Triton-100 in PBS) for 1h at RT, followed by incubation with anti-HA (1:500) in PBS with 1% BSA, 0.3% Triton X-100 for 1h at 37°C, then washed tree times of 5 minutes with PBS, incubated with secondary antibody Alexa Fluor goat anti-rabbit546® (Invitrogen) followed by incubation with DAPI (Invitrogen) solution according to the manufacture instructions in PBS for 15 min at RT. The cells were subsequently washed three times for 10 min each in PBS. Coverslips were mounted on a glass slide with antifade and observed at confocal microcopy Leica TCS SP5.

**Western blotting.** SF21 cells ( $3.5 \times 10^6$  cells) were infected separately with each virus construction (MOI = 10). We collected the cells at 6, 12, 24, 48 e 72 h p.i. and washed tree times with PBS (137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) followed by steps of centrifugation ( $5,000 \times g$ ). The resulting pellets were resuspended in PBS, mixed with

the same volume of loading buffer (0.25 M Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, and 0.02% bromophenol blue), heated for 5 min at 100 °C and subjected to 12% SDS-PAGE gels. After electrophoresis size separation, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated with blocking solution (0.2% BSA in PBS), washed three times in washing solution (0.5% Tween-20 in PBS) and incubated with different primary antibodies: anti-HA produced rabbit or anti-actin, anti-IE1, and anti-GP64 produced in mouse. The membranes were then washed three times in washing solution, incubated with secondary antibody conjugated with ECL<sup>TM</sup> Plex goat-a-mouse IgG Cy<sup>TM</sup> 2 and then revealed in ImageQuant<sup>TM</sup> LAS 4000.

**Viral growth curve.** To investigate whether the loss of the full length *p94* would impact growth properties of recombinant viruses,  $3.5 \times 10^6$  cells SF21 cells were seeded on 45 mm dish and separately infected with all the recombinant viruses (MOI = 0,5 and MOI = 10). After 1 h, the inoculum was removed, and the cells monolayer washed twice with fresh media and incubated at 25 °C. The viral yield was evaluated at 0, 24, 48, and 72 h p.i. by TCID50 assay (O'Reilly et al., 1994). The experiment was performed in triplicate.

**Analysis of OB production.** To evaluate whether the loss the full length of *p94* would impact OB production. SF21 cells were seeded on 45 mm dishes ( $3.5 \times 10^6$  cells per dish) and infected for one hour separately with all vAc-pol, vAc-pol-p94-del, and vAc-pol-p94-ha-rep (MOI = 5). The OBs of each virus was purified at 72 and 120 h p.i and counted in hemocytometer, as previously described (O'Reilly et al., 1994). The experiment was performed in four biological replicates.

**Analysis of viral DNA replication.** To quantify viral DNA replication,  $1 \times 10^6$  Sf21 cells were seeded in three 35 mm dishes and separately infected with all the recombinant viruses (MOI = 0.5). After 1 h, the inoculum was removed, and the cell monolayer washed twice with fresh media, and incubated at 25 °C. The infected cells were collected at 0, 6, 12, 18, 24, 36 and 48 h p.i. The

total DNA extracted using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). The q-PCR assays were performed in Rotor-gene-Q (QIAGEN) with SYBR Green JumpStart™ TaqReadyMix™ (SIGMA) using specific primer to amplify a 100-bp region of the AcMNPV*gp41* gene, as previously described (Vanarsdall et al., 2005). The experiment was performed in biological duplicate. The data was analyzed in Rotor-Gene Q Series Software and the averages of values are plotted.

**Growth competition assays.** For the competition assay,  $1 \times 10^6$  Sf21 cells were seeded in three 35 mm dishes and three infections are performed: *vAc-polh*, *vAc-polh-p94-del* and both (MOI = 0.1). After 72 h p.i. the DNA was extracted like described above and all samples are analyzed with q-PCR assays using the primers GP41-F, GP41-R, Cm-qPCR-F and Cm-qPCR-R. The DNA absolute quantity was calculated using specific standard curves for each primer pair. GP41-F and GP41-R detect both virus and Cm-qPCR-F and Cm-qPCR-R detect only the *vAc-polh-p94-del*. In the mixed infection *vAc-polh* DNA amount was calculated subtracting the *vAc-polh-p94-del* DNA quantity of the total DNA quantity. Purified amplicons of each primer pair were used for standard curves. The DNA was quantified with a NanoVue Plus Spectrophotometer and the number of DNA copies were calculated based on the DNA concentration. The q-PCR assays are performed using the same equipment and software described above.

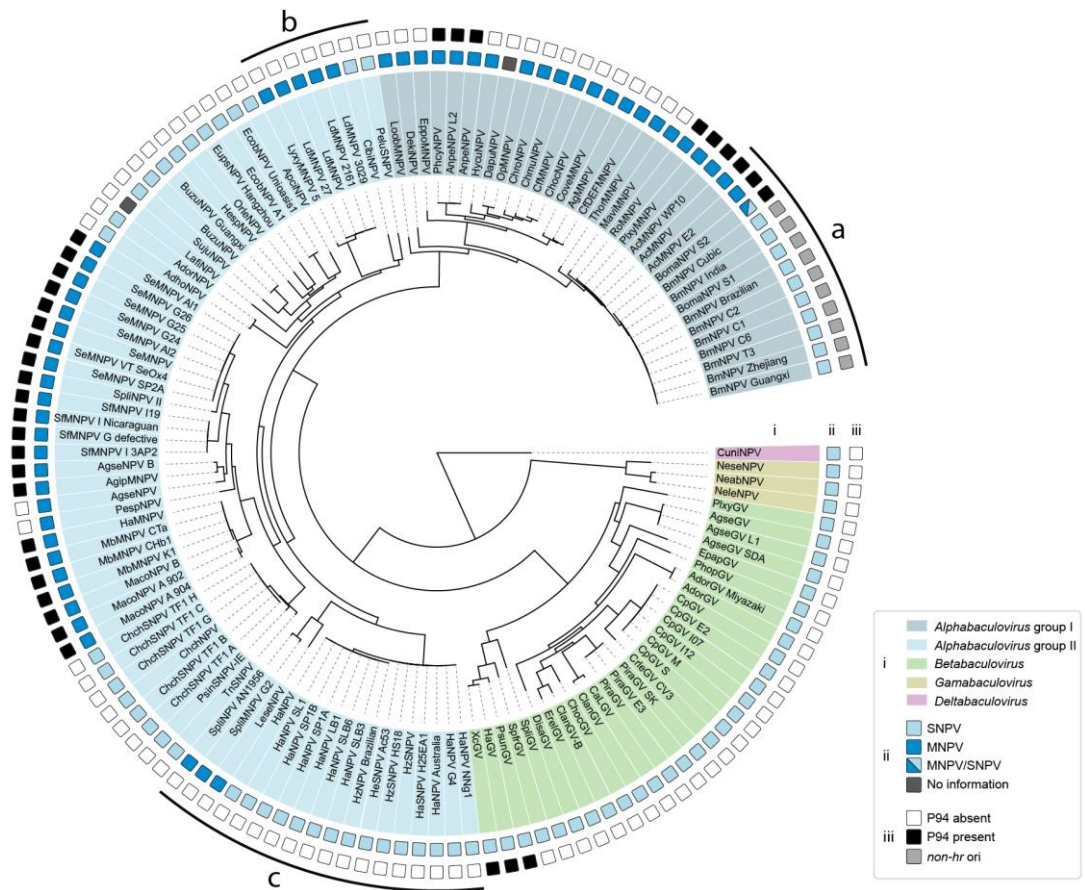
**Bioassay.** *Chrysodeixis includes* 1<sup>st</sup> instar larvae were used in bioassays. The larvae were fed on artificial diet (Barrionuevo et al., 2012). Insects in triplicate (n=60 per treatment) were allowed to feed *ad libitum* on virus-contaminated (*vAc-polh*, *vAc-polh-p94-del*, and *vAc-polh-p94-ha-rep*) diet for 24 h, as previously described (Ardisson-Araújo et al., 2015). We used two concentration of virus  $1 \times 10^5$  and  $3 \times 10^5$  OBs/ml. After 24 h, the insects were transferred to a new plastic vial with clean diet. A group with no treatment (n=60) was set up as control. Mortality was recorded by scoring the number of dead insects.

**Transmission electron microscopy.** Tn5B cells transfected Bacmids DNA and Sf21 cells infected with the recombinant virus were observed by Transmission electron microscopy. The cells were collected at 96 h.p.t. and fixed in Karnovsky fixative (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, in 0.1 M, cacodylate buffer, pH 7.2) for 2 h, post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h at room temperature (25 °C) and then stained *en bloc* with 0.5% aqueous uranyl acetate, dehydrated in acetone, embedded in Spurr's low viscosity embedding medium and polymerized for 2 days at 60 °C . The ultrathin sections were contrasted with 2% uranyl acetate and observed in a ZEISS TEM 109 at 80 kV. The number of nucleocapsids per occlusion-derived virus (ODV) was counted for approximately 90 ODVs for each mutant.

## RESULTS

### **Mapping nucleocapsid aggregation phenotype onto baculovirus phylogeny.**

A comprehensive review of the nucleocapsid aggregation morphotype of all completely sequenced baculovirus was conducted. To our knowledge, no morphotype data was available for *Dasychira pudibunda* nucleopolyhedrovirus (DapuNPV) and *Lambdina fiscellaria* nucleopolyhedrovirus (LafiNPV). The resulting morphotype information was mapped along the core gene phylogenetic tree, and a significant association between these morphotypes and the baculovirus phylogeny was observed (data not shown). As shown in Fig. 1, it was possible to observe clades containing discordant morphotypes (clades a, b and c). The clade a contained only closely related species (AcMNPV/ BomaNPV /BmNPV), while clade b and c included a more divergent group of species. From these tree clades we selected clade a to perform a whole genome comparison. As shown in Fig. S1, only *p94 (ac134)* was present in AcMNPV and BomaNPV (both MNPV), but absent in BmNPV (SNPV).

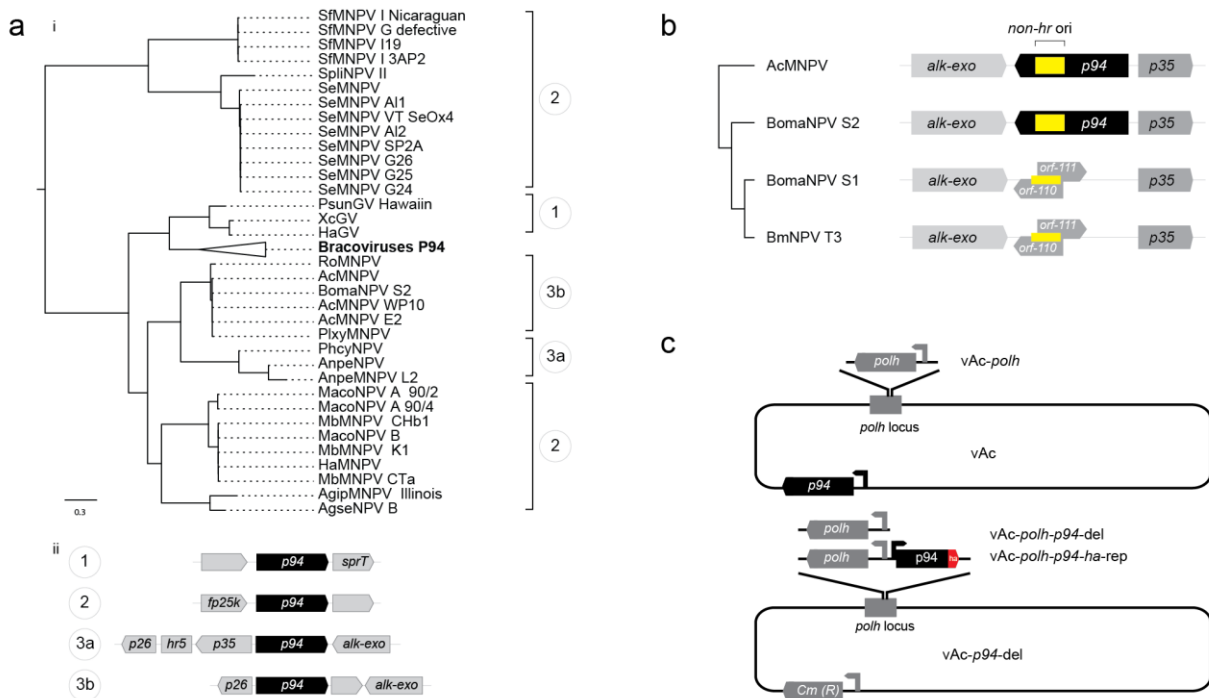


**Figure 1. Baculovirus phylogeny and trait correlation.** A maximum likelihood tree inferred using an alignment of 37 baculovirus core gene. The MNPV trait is associated with the phylogeny, and four groups of MNPVs are observed. The clades with contrasting morphotypes are highlighted (a, b and c). The distribution of *p94* homologs in all sequenced genomes is shown.

### Phylogeny and genomic context of *p94*.

We found *p94* homologues in alpha- and betabaculoviruses, but none could be found in delta- or gammabaculoviruses. Additionally, *p94* homologues were also found in bracovirus, which are viruses associated with braconid wasps. The phylogenetic tree suggests the presence of tree *p94* clades. One formed by betabaculoviruses and bracoviruses (Fig. 2a), and the others formed by sequences from *Alphabaculovirus* group I and group II, respectively. The BmNPV isolates present a partial loss of *p94* with a reminiscent region of the *p94*, a *non-hr ori* (Fig. 2b).





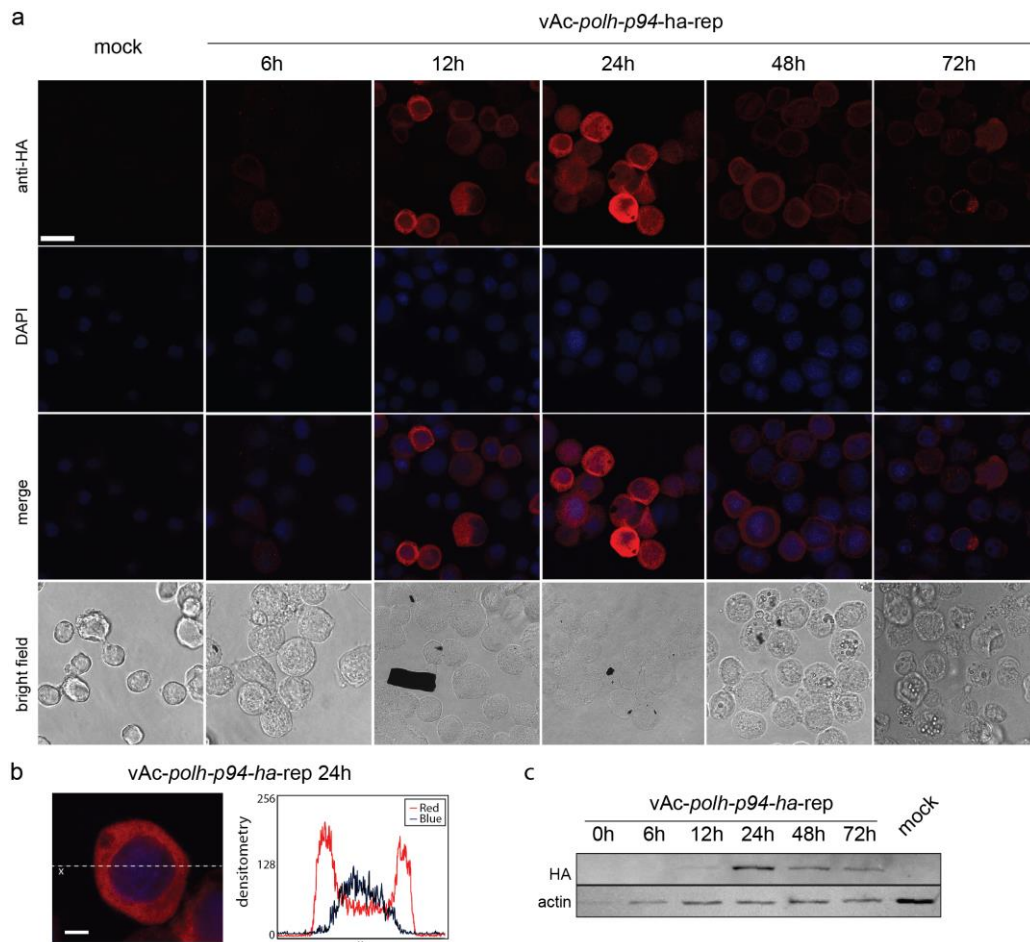
**Figure 2. *p94* phylogeny, genomic context and virus constructions.** **a.** maximum likelihood phylogenetic inference of *p94* homologs (*i*), the tree was mid-point rooted for clarity. Note that Bracovirus homologues are more related to the GV *p94*. The genomic context of each group is shown (*ii*), note that there are tree different contexts and the third has a small variation. **b.** Alignment of *p94* loci of AcMNPV, BmNPV and BomaNPV-S1 and –S2. It is important to note that all viruses have conserved *non-hr-ori*. **c.** Schematic representation of virus construction. vAc-*polh* is derived from bacmid (vAc) and the vAc-*polh-p94-del* and vAc-*polh-p94-ha-rep* are derived from the vAc-*p94-del* bacmid.

**Construction of AcMNPV bacmid mutants with *p94* deleted and repaired.**

To characterize the protein P94, an AcMNPV mutant (vAc-*polh-p94-del*) with ac134 knocked out, including the small *non-hr ori*, was constructed based on the bacmid bMON14272 (Fig. 2c). The ac134 deletion was confirmed by PCR (data not shown). A parental virus (vAc-*polh*) and an ac134 knockout repair (vAc-*polh-p94-ha-rep*) were also constructed (Fig. 2c). Infectious virions were produced after transfection of Tn5b cells with the recombinants bacmids.

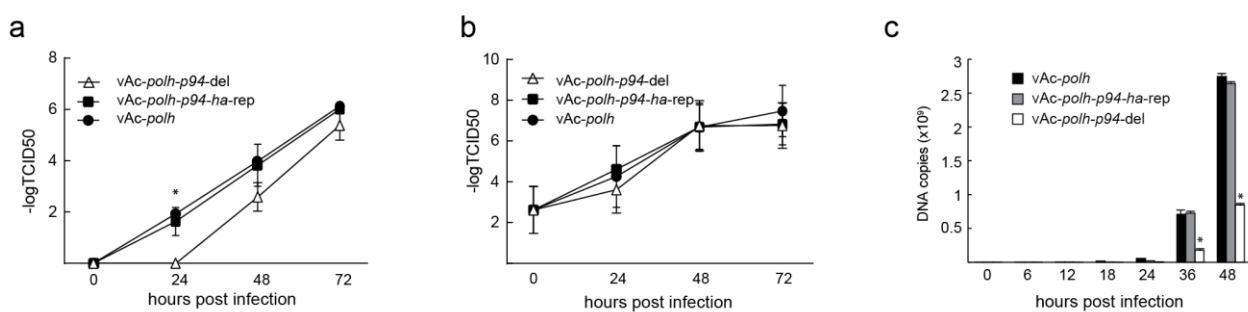
**P94 is a cytoplasmic protein, and its deletion causes a delay in BV production, viral DNA replication, and *ie1* expression.**

The expression patterns and intracellular localization of P94 protein was first examined by confocal microscopy of the Sf21 cells infected with the HA-tagged recombinant *vAc-polh-p94-ha-rep* at an MOI of 5. As shown in Fig. 3a, weak fluorescence was first observed in the cell cytoplasm at 6 h post-infection (p.i.), with expression peak at 24 h p.i. The cytoplasmic localization was confirmed by densitometry analysis (Fig. 3c) Moreover, Western blot assay was able to detected P94 only from 12 h p.i with expression peak at h p.i. (Fig. 3c).



**Figure 3. Immunofluorescence analysis of p94 expression.** **a.** Confocal micrographs of Sf21 cells infected with *vAc-polh-p94-ha-rep* at 6, 12, 24, 48 and 72 h p.i., the nucleus was counterstained with DAPI (blue) and the Anti-HA was stained with anti-mouse Alexa Fluor® 546 (red). Note that the expression of p94 can be detected at 6 h p.i. with maximum fluorescence level at 24 h p.i. **b.** Densitometry of red and blue pixels alongside the cross-section of a Sf21 cell infected with *vAc-polh-p94-ha-rep* at 24 h p.i. confirming the cytoplasmic localization of P94. **c.** Western blot analysis of P94 expression in Sf21 cells. Note that the high level of expression is in 24h p.i. The anti-actin was used as loading control.

To determine the effect of p94 deletion on ACMNPV replication, Sf21 cells were separately infected with *vAc-polh*, *vAc-polh-p94-del*, and *vAc-polh-p94-ha-del*. The supernatant of all infections were collected at different times p.i. and BV production was determined by TCID50 endpoint dilution assays. Whereas all viruses were able to produce infectious BVs, the *vAc-polh-p94-del* at M.O.I of 0.5 presented a delay in BV production when compared to the other viruses (Fig. 4a). No significant difference was observed at MOI of 10 (Fig. 4b). As presented in Fig. 4c, DNA replication was delayed in insect cells infected with *vAc-polh-p94-del*. Western-blot analysis of Sf21 cells extracts infected with *vAc-polh*, *vAc-polh-p94-del*, and *vAc-polh-p94-ha-del* showed a delay in the expression of the transcriptional activator immediate early protein 1 (IE-1) (data not shown). Taken together, these results suggest that *p94* is not an essential gene but its presence may increase the overall viral production.

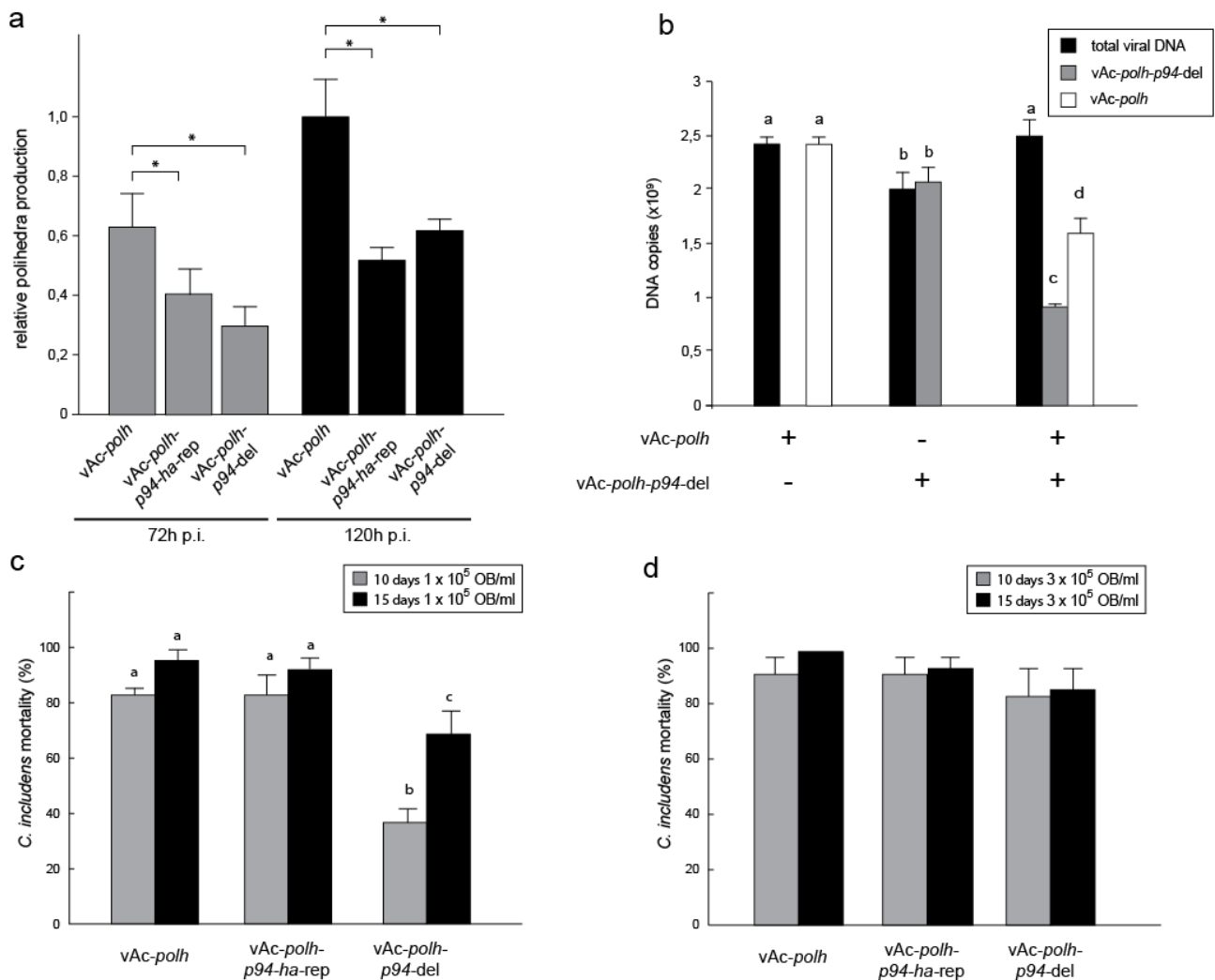


**Figure 4. Time course analysis of BV production and DNA replication.** Virus growth curve of *vAc-polh*, *vAc-polh-p94-del* and *vAc-polh-p94-ha-rep*. Each point represent the  $-\log\text{TCID}_{50}$  of supernatant of Sf21 cells infected at MOI = 0,5 (a) and MOI = 10 (b). Note that the impact of p94 deletion on the BV production is more evident at low MOI. c. Time course of DNA replication in infected Sf21 cells at MOI = 0,5, each point represent the absolute number of DNA copies determined by q-PCR. Note that the number of *vAc-polh-p94-del* DNA copies grows with a delay. Asterisk indicates differences with  $p$  value < 0.05.

#### ***p94* full length deletion causes decrease of OB production.**

To evaluate the capacity of each virus in OB production, Sf21 cells were separately infected with each virus and at 72 and 120 h p.i. the OB as purified and counted (Fig. 5a). The OB production of *vAc-polh-p94-del* was smaller than *vAc-polh-p94-ha-rep* and *vAc-polh* at 72 h.p.i

and, of unexpected way, at 120 h p.i. the vAc-polh-p94-del OB production was smaller than vAc-pol-p94-ha-rep but larger than vAc-pol-p94-ha-rep.



**Figure 5. OB production, growth competition assay and bioassay.** **a.** Relative OB (polyhedral) production in Sf21 cells, at 72 h p.i. and 120 h p.i. the vAc-polh-p94-del produce less OBs than vAc-polh. In an unexpected way, the vAc-polh-p94-del has the same OB production of vAc-polh-p94-ha-rep at any times. **b.** Cell competition assay, the number of viral DNA copies was determined by q-PCR. In the co-infection the vAc-polh-p94-del DNA quantity is lower than vAc-polh. **c.** percent of *C. includens* larvae death using 1x10<sup>5</sup> OB/ml and 3x10<sup>5</sup> OB/ml (**d**). The vAc-polh-p94-del has a lower mortality than the controls in the dose of 1x10<sup>5</sup> OB/ml. No differences are observed with the dose of 3x10<sup>5</sup> OB/ml. Letters and asterisks indicate differences with *p* value < 0.05.

**The *in vitro* replicative fitness of the vAc-polh-p94-del is reduced.**

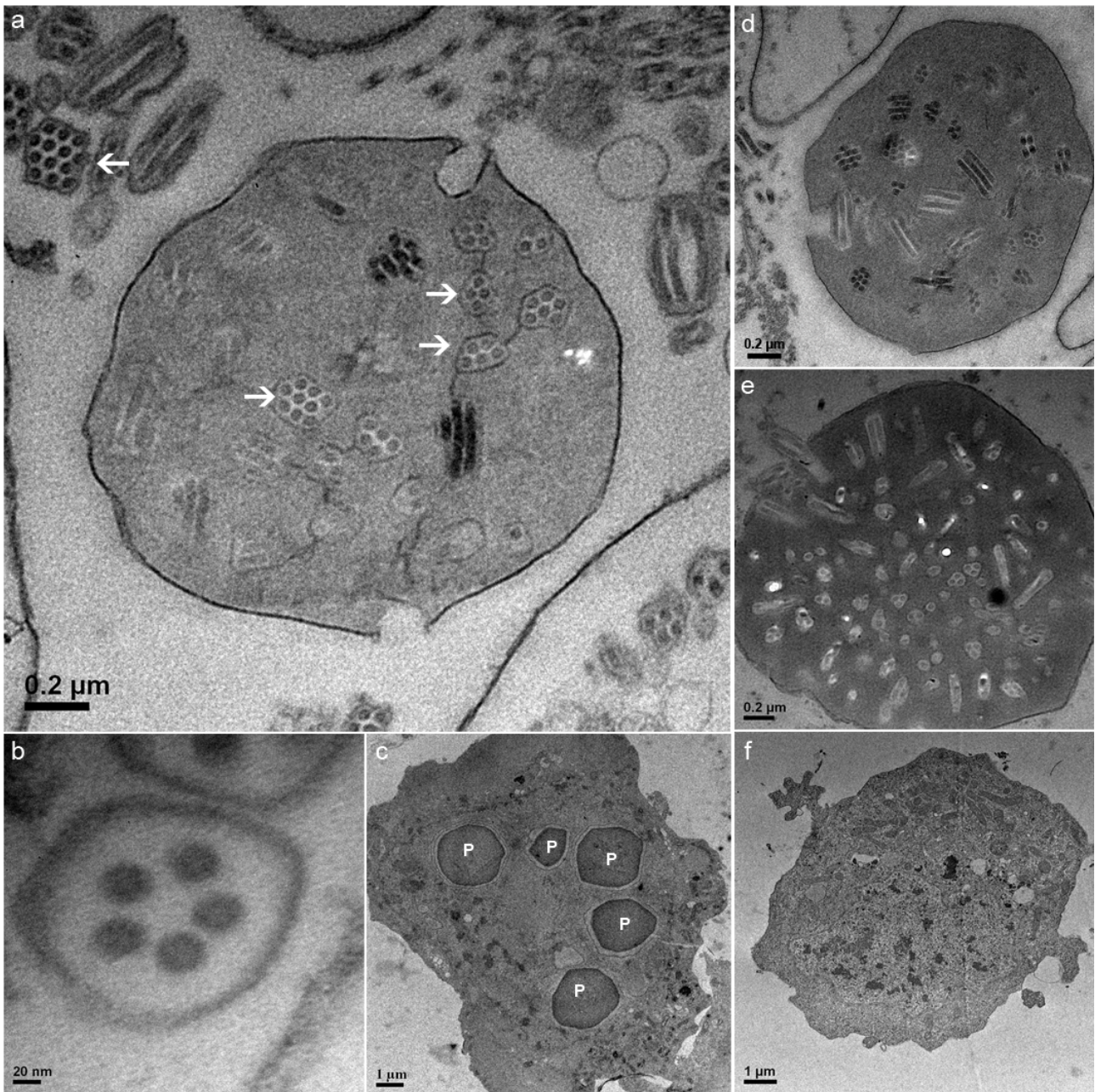
In order to check the impact of p94 full length in the virus fitness, Sf21 cells were simultaneously infected with both vAc-*polh* and vAc-*polh-p94-del* at the same M.O.I (0.1). As shown in Fig. 5b, at 72 h.p.i the amount of viral DNA from vAc-*polh* was higher than vAc-*polh-p94-del*, suggesting that the replicative fitness of the former is higher.

**vAc-*polh-p94-del* was less lethal to larvae of *Chrysodeixis includens*.**

To examine the effect that p94 may have on viral infection *in vivo*, first instar larvae of *Chrysodeixis includens* were fed on diet contaminated with OBs of vAc-*polh*, vAc-*polh-p94-del*, and vAc-*polh-p94-ha-del*. As shown in Fig. 5c, mortality of larvae infected with  $1 \times 10^5$  OB/ml of vAc-*p94-del* was lower when compared with the other viruses at the same OB concentration. However, no difference was detected when  $3 \times 10^5$  OB/ml was used (Fig 5d).

***p94* knockout does not change the AcMNV morphotype.**

To evaluate the impact of *p94* knockout transmission electron microscopy analysis of Sf21 cells infected with vAc-*polh*, vAc-*polh-p94-del*, and vAc-*polh-p94-ha-del* at 96 h p.i. was performed. As shown in Fig 6, no differences in nucleocapsid envelopment were observed for the *p94*-deleted virus (Fig S2).



**Figure 6. Transmission electron microscopy analysis.** **a.** polyhedron from Sf21 cells infected with *vAc-polh-p94-del* showing various ODVs with multiples nucleocapsids (arrows), showing that the p94 disruption does not change the MNPV phenotype. **b.** Zoom in a *vAc-polh-p94-del* ODV clearly showing multiples nucleocapsids cross sectioned. **c.** Sf21 cell infected with *vAc-polh-p94h-del* showing polyhedral (P) in the nucleus. **d.** *vAc-polh-p94-ha-rep* polyhedron. **e.** *vAc-polh* polyhedron, as a MNPV morphotype control. **f.** Uninfected Sf21 cell control revealing no viral production.

## DISCUSSION

Although several genes have been identified somehow influencing the production of MNPVs (Feng et al., 2012; Tao et al., 2013; Wu and Passarelli, 2010; Yu et al., 2009) the genetic basis of ODV nucleocapsid envelopment is still unknown. In this study, the evolution of SNPVs and MNPVs morphotypes along baculovirus phylogeny was investigated in order to identify potential genes related to this process. A group of closely related genomes (AcMNPV, BomaNPV, and BmNPV) with contrasting morphotypes was identified. The genome comparison revealed that they differ with respect to the absence/presence of only one gene, namely, *p94* gene (*ac134*), which was present in both AcMNPV and BomaNPV but absent in BmNPV. Phylogenetic analysis showed that P94 was present in several baculoviruses (in both alpha- and betabaculoviruses) and also in bracoviruses, a group of mutualistic DNA virus integrated into wasp genomes (Drezen et al., 2006). As previously reported (Kim and Hepat, 2015), this result suggests a horizontal gene transfer from baculovirus to bracovirus during an ancient coinfection event of a lepidopteran host.

In bracoviruses, the P94 acts suppressing the immune system and developmental processes of the parasitized larvae and is expressed in the host tissues from the first day after inoculation, warranting the development of the wasp larvae (Kim and Hepat, 2015). In baculoviruses, a recombinant *p94*-null AcMNPV was shown to have no influence in the ability of the virus to kill both *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia ni* larvae by oral or intra-hemocoelic inoculation (Clem et al., 1994). Moreover, the AcMNPV *p94* mRNA was first detected at 6 h p.i. (Friesen and Miller, 1987) with peaks at 12 and 18 h p.i. (Chen et al., 2013). Here, we have found that the P94 protein is detected in the cytoplasm of infected cells at 6 h p.i., with a peak at 24 h p.i. Indeed, we did not detect any nuclear localization signal in the AcMNPV P94 protein, in contrast to the results obtained for P94 of *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV) (Kim and Hepat, 2015).

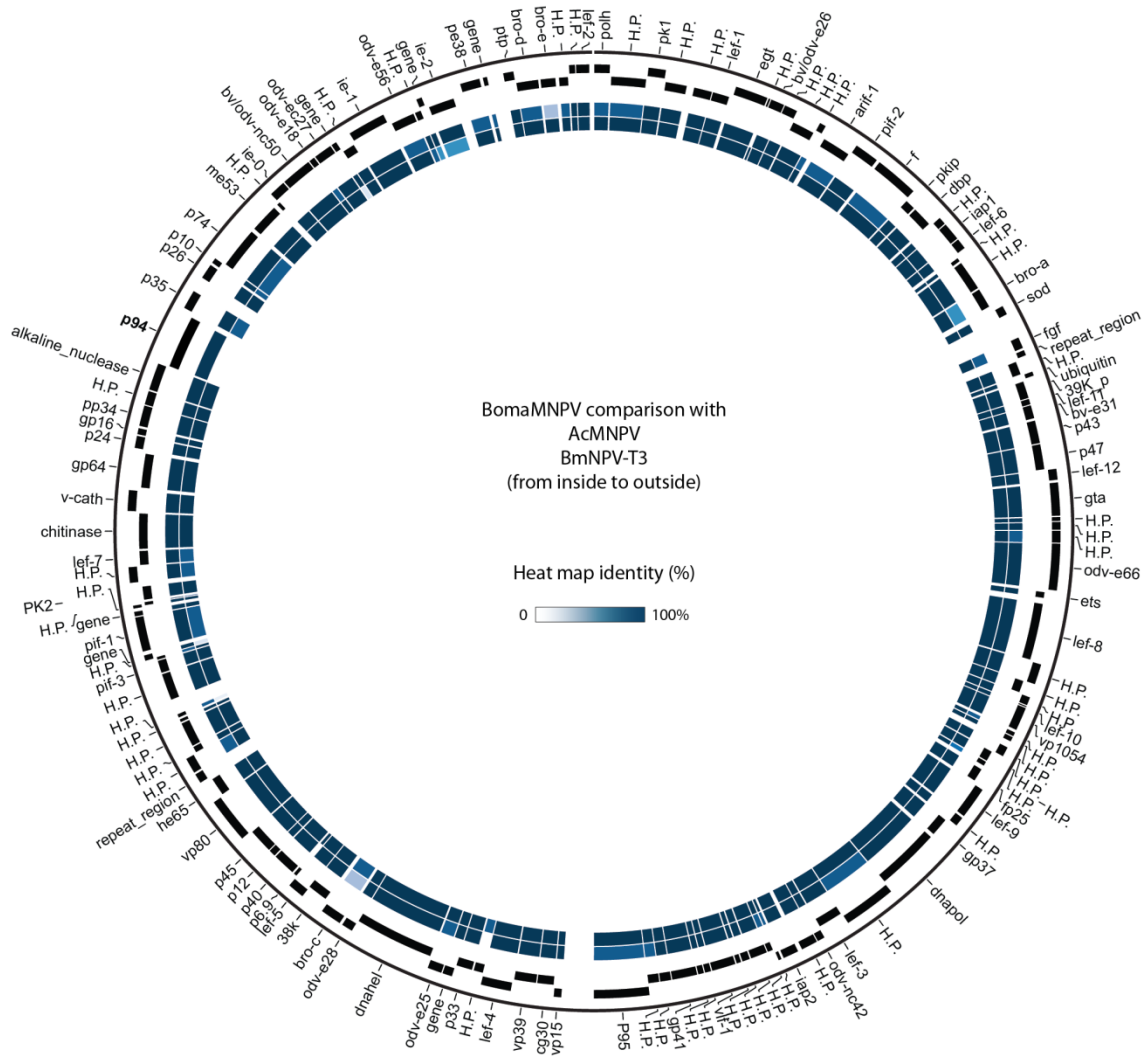
The vAc-*polh-p94-del* growth curve was delayed when compared to the other viruses, which is usually the result of a delay on DNA replication, nucleocapsid assembly and/or membrane

budding (Rohrmann, 2013b). Actually, IE-1 production and DNA replication were also delayed in insect cells infected with vAc-*polh-p94-del*, suggesting that *p94* is important to an efficient viral replication and BV production. However, the AcMNPV *p94* gene has a non-homologous DNA replication origin (*non-hr ori*) (Kool et al., 1994), and its deletion might have contributed to the observed results. On the other hand, it has been suggested that viruses with deletion on *non-hr ori* were most resistant to the genesis of defective interfering virus cell culture and maybe useful for heterologous expression in insect cells (Pijlman et al., 2002). Therefore, the utility of vAc-*polh-p94-del* as tool for heterologous expression should be evaluated. In contrast with the observed in *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia ni* larvae (Clem et al., 1994), the ability of vAc-*polh-p94-del* to kill *Chrysodeixis includens* larvae was reduced at lower viral dose. However, it is difficult to conciliate these results due to the absence of the *non-hr ori* in our mutant (vAc-*polh-p94-del*). Moreover, no difference in nucleocapsid envelopment was observed in cells infected with *p94*-deleted virus. This result is consistent with the fact that P94 was only found in the cytoplasm of infected cells. Despite all NPV which has *p94* are MNPV the reciprocal is not true, and the *p94* gene was not present in all MNPVs. In the specific case of BomaNPV-S2, the virus infection cause a single or multiple phenotype depending on the cell lineage (Xu et al., 2012). It is reasonable to postulate that cell physiology is also an important determinant for the appearance of MNPV phenotype.

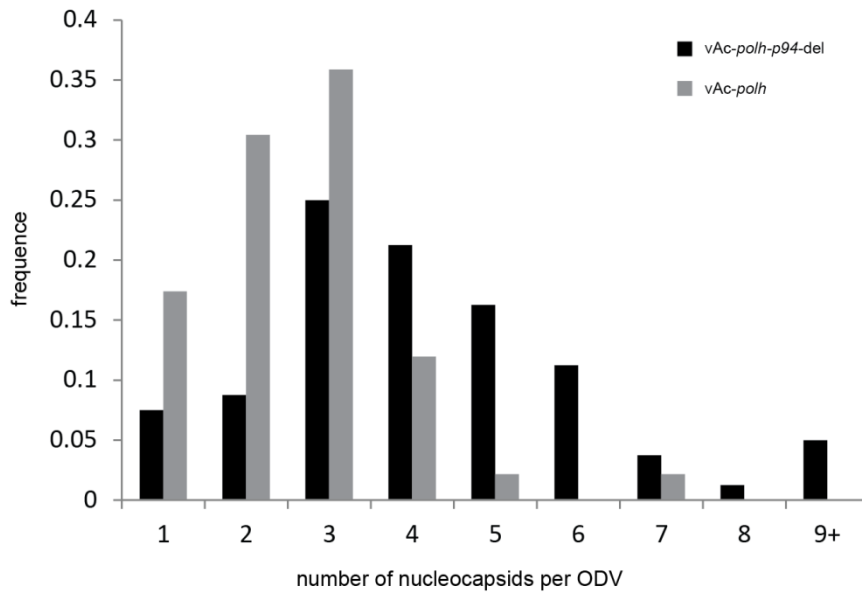
To summarize, we mapped the MNPV phenotype alongside the phylogenetic tree, we determine the *P94* phylogeny and its expression kinetics. We found that the lack of full length of *p94* (including the *non-hr-ori*) in AcMNPV impacted BV production, DNA replication, early gene expression, but not ODV nucleocapsid envelopment. Further studies will be conducted to determine the impact of P94 expression on the suppression of host immune system.



Supplementary Figures



**Figure S1. Genome comparison of BomaNPV-S2 vs AcMNPV and BmNPV-T3.** The outside genome is the BomaNPV-S2 which contain p94, the inner genomes are (from outside to inside) AcMNPV and BmNPV-T3. The bands represents the open reading frames (ORF) of each genome. The inner bands are colorful according with the identity with the outside band (BomaNPV-S2 ORF) according to the legend. Note that the BmNPV does not have the p94 ORF.



**Figure S2. The distribution of the number of nucleocapsids per ODV.** On the x-axis is the number of nucleocapsids per ODV and on the y-axis the frequency of the number of nucleocapsids per ODV. The frequencies are shown for vAc-polh and vAc-polh-p94-del.

**Table S1.** Complete genomes used for baculovirus phylogeny and MNPV vs SNPV phenotype information.

| <b>Abbreviation</b> | <b>Accession</b> | <b>Isolate</b>  | <b>Reference</b>              | <b>Phenotype</b> |
|---------------------|------------------|---|-------------------------------|------------------|
| AcMNPV              | L22858           | Autographa californica nucleopolyhedrovirus clone C6              | (Ayres et al., 1994)          | MNPV             |
| AcMNPV E2           | KM667940         | Autographa californica nucleopolyhedrovirus strain E2             | (Ayres et al., 1994)          | MNPV             |
| AcMNPV WP10         | KM609482         | Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus isolate WP10 | (Ayres et al., 1994)          | MNPV             |
| AdhoNPV             | AP006270         | Adoxophyes honmai nucleopolyhedrovirus DNA                        | (Nakai et al., 2003)          | SNPV             |
| AdorGV              | AF547984         | Adoxophyes orana granulovirus                                     | G                             | GV               |
| AdorGV-Miyazaki     | KM226332         | Adoxophyes orana granulovirus strain Miyazaki                     | G                             | GV               |
| AdorNPV             | EU591746         | Adoxophyes orana nucleopolyhedrovirus                             | (Hilton and Winstanley, 2008) | SNPV             |
| AgipMNPV Illinois   | EU839994         | Agrotis ipsilon multiple nucleopolyhedrovirus strain Illinois     | (Boughton et al., 1999)       | MNPV             |
| AgMNPV              | DQ813662         | Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus                        | (Allen et al., 1977)          | MNPV             |
| AgseGV              | AY522332         | Agrotis segetum granulovirus                                      | G                             | GV               |
| AgseGV L1           | KC994902         | Agrotis segetum granulovirus strain L1                            | G                             | GV               |
| AgseGV SDA          | KR584663         | Agrotis segetum granulovirus strain DA                            | G                             | GV               |
| AgseNPV             | DQ123841         | Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus                              | (Allaway and Payne, 1983)     | MNPV             |
| AgseNPV B           | KM102981         | Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus B isolate English            | (Allaway and Payne, 1983)     | MNPV             |
| AnpeNPV             | DQ486030         | Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus                             | (Fan et al., 2007)            | MNPV             |
| AnpeNPV L2          | EF207986         | Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus isolate AnpeMNPV-L2         | (Fan et al., 2007)            | MNPV             |

|                 |          |  |                                |      |
|-----------------|----------|--|--------------------------------|------|
| ApciNPV         | FJ914221 | <i>Apocheima cinerarium</i> nucleopolyhedrovirus                               | (Hughes, 1978)                 | SNPV |
| BmNPV Brazilian | KJ186100 | <i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus strain Brazilian                       | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BmNPV C1        | KF306215 | <i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus isolate C1                             | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BmNPV C2        | KF306216 | <i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus isolate C2                             | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BmNPV C6        | KF306217 | <i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus isolate C6                             | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BmNPV Cubic     | JQ991009 | <i>Bombyx mori</i> NPV strain Cubic  | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BmNPV Guangxi   | JQ991011 | <i>Bombyx mori</i> NPV strain Guangxi  | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BmNPV India     | JQ991010 | <i>Bombyx mori</i> NPV strain India  | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BmNPV T3        | L33180   | <i>Bombyx mori</i> nuclear polyhedrosis virus isolate T3                       | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BmNPV Zhejiang  | JQ991008 | <i>Bombyx mori</i> NPV strain Zhejiang   | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BomaNPV S1      | FJ882854 | <i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus isolate S1                        | (Ardisson-Araújo et al., 2014) | SNPV |
| BomaNPV S2      | JQ071499 | <i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus S2                                | (Xu et al., 2012)              | MNPV |
| BusuNPV         | KF611977 | <i>Buzura suppressaria</i> nucleopolyhedrovirus isolate Hubei                  | (Hu et al., 1993)              | SNPV |
| Buzu Guangxi    | KM986882 | <i>Buzura suppressaria</i> nucleopolyhedrovirus isolate Guangxi                | (Hu et al., 1993)              | SNPV |
| CaLGV           | KC179784 | <i>Clostera anastomosis</i> granulovirus isolate CaLGV-Henan                   | G                              | GV   |
| CfDEFMNPV       | AY327402 | <i>Choristoneura fumiferana</i> defective nucleopolyhedrovirus complete genome | (de Jong et al., 2005)         | MNPV |
| CfMNPV          | AF512031 | <i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV polyhedrin                                | (de Jong et al., 2005)         | MNPV |
| ChchNPV         | AY864330 | <i>Chrysodeixis chalcites</i> nucleopolyhedrovirus                             | (van Oers et al., 2005)        | SNPV |

|                |          |  |                         |      |
|----------------|----------|--|-------------------------|------|
| ChchSNPV TF1 A | JX535500 | Chrysodeixis chalcites SNPV TF1-A                                      | (van Oers et al., 2005) | SNPV |
| ChchSNPV TF1 B | JX560540 | Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus genotype<br>ChchSNPV-TF1-B | (van Oers et al., 2005) | SNPV |
| ChchSNPV TF1 C | JX560539 | Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus genotype<br>ChchSNPV-TF1-C | (van Oers et al., 2005) | SNPV |
| ChchSNPV TF1 G | JX560541 | Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus genotype<br>ChchSNPV-TF1-G | (van Oers et al., 2005) | SNPV |
| ChchSNPV TF1 H | JX560542 | Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus genotype<br>ChchSNPV-TF1-H | (van Oers et al., 2005) | SNPV |
| ChmuNPV        | KF894742 | Choristoneura murinana alphabaculovirus strain Darmstadt               | (Rohrmann et al., 1982) | MNPV |
| ChocGV         | DQ333351 | Choristoneura occidentalis granulovirus                                | G                       | GV   |
| ChocNPV        | KC961303 | Choristoneura occidentalis alphabaculovirus                            | (Rohrmann et al., 1982) | MNPV |
| ChroNPV        | KC961304 | Choristoneura rosaceana alphabaculovirus                               | (Rohrmann et al., 1982) | MNPV |
| ClanGV         | HQ116624 | Clostera anachoreta granulovirus isolate ClanGV-HBHN                   | G                       | GV   |
| ClasGV B       | KR091910 | Clostera anastomosis granulovirus strain ClasGV-B                      | G                       | GV   |
| ClbiNPV IDZ1   | DQ504428 | Clanis bilineata nucleopolyhedrosis virus isolate DZ1                  | (Zhu et al., 2009)      | SNPV |
| CoveMNPV       | KJ631623 | Condylorrhiza vestigialis MNPV   | (Castro et al., 2009)   | MNPV |
| CpGV           | U53466   | Cydia pomonella granulovirus   | G                       | GV   |
| CpGV E2        | KM217577 | Cydia pomonella granulovirus isolate CpGV-E2                           | G                       | GV   |
| CpGV I07       | KM217574 | Cydia pomonella granulovirus isolate CpGV-I07                          | G                       | GV   |
| CpGV I12       | KM217576 | Cydia pomonella granulovirus isolate CpGV-I12                          | G                       | GV   |

|                   |             |   |                             |      |
|-------------------|-------------|---|-----------------------------|------|
| CpGV M            | KM217575    | Cydia pomonella granulovirus isolate CpGV-M                         | G                           | GV   |
| CpGV S            | KM217573    | Cydia pomonella granulovirus isolate CpGV-S                         | G                           | GV   |
| CrleGV CV3        | AY229987    | Cryptophlebia leucotreta granulovirus isolate CV3                   | G                           | GV   |
| CuniNPV           | AF403738    | Culex nigripalpus baculovirus                                       | (Moser et al., 2001)        | SNPV |
| DapuNPV cregenes  | KP747440    | Dasychira pudibunda nucleopolyhedrovirus isolate ML1                | ?                           | ?    |
| DekiNPV           | JX193905    | Dendrolimus kikuchii nucleopolyhedrovirus strain YN, partial genome | (Yang et al., 2011)         | MNPV |
| DisaGV            | Unpublished | Diatraea saccharalis granulovirus                                   | G                           | GV   |
| EcobNPV A1        | DQ837165    | Ecotropis obliqua NPV strain A1                                     | (Ma et al., 2006)           | SNPV |
| EcobNPV Unioasis1 | KC960018    | Ectropis obliqua nucleopolyhedrovirus strain unioasis 1             |                             | SNPV |
| EpapGV            | JN408834    | Epinotia aporema granulovirus                                       | G                           | GV   |
| EppoMNPV          | AY043265    | Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus                           | (Hyink et al., 2002)        | MNPV |
| ErelGV            | KJ406702    | Erinnyis ello granulovirus  | G                           | GV   |
| EupsNPV Hangzhou  | FJ227128    | Euproctis pseudoconspersa nucleopolyhedrovirus strain Hangzhou      | (Tang et al., 2009)         | SNPV |
| HaGV              | EU255577    | Helicoverpa armigera granulovirus                                   | G                           | GV   |
| HaMNPV            | EU730893    | Helicoverpa armigera multiple nucleopolyhedrovirus                  | (Gettig and McCarthy, 1982) | MNPV |
| HaNPV             | AF303045    | Helicoverpa armigera nuclear polyhedrosis virus                     | (Chen et al., 2002)         | SNPV |
| HaNPV Australia   | JN584482    | Helicoverpa armigera NPV strain Australia                           | (Chen et al., 2002)         | SNPV |
| HaNPV G4          | AF271059    | Heliocoverpa armigera nucleopolyhedrovirus G4                       | (Chen et al., 2002)         | SNPV |

|                 |          |  |                      |      |
|-----------------|----------|--|----------------------|------|
| HaNPV NNg 1 DNA | AP010907 | Helicoverpa armigera NPV NNg1 DNA                                | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HaNPV SL1       | KT013224 | Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus strain L1              | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HaNPV SLB1      | KJ701029 | Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus strain LB1             | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HaNPV SLB3      | KJ701030 | Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus strain LB3             | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HaNPV SLB6      | KJ701031 | Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus strain LB6             | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HaNPV SP1A      | KJ701032 | Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus strain SP1A            | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HaNPV SP1B      | KJ701033 | Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus strain SP1B            | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HaSNPV H25EA1   | KJ922128 | Helicoverpa armigera SNPV isolate H25EA1                         | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HeSNPV Ac53     | KJ909666 | Helicoverpa SNPV AC53  | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HespNPV         | KF158713 | Hemileuca sp. nucleopolyhedrovirus                               |                      | SNPV |
| HycuNPV         | AP009046 | Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus genomic DNA                | (Ikeda et al., 2006) | MNPV |
| HzNPV Brazilian | KM596835 | Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus isolate Br/South     | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HzSNPV          | AF334030 | Helicoverpa zea single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus         | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| HzSNPV HS18     | KJ004000 | Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus strain HS-18         | (Chen et al., 2002)  | SNPV |
| LafiNPV GR15    | KP752043 | Lambdina fiscellaria nucleopolyhedrovirus isolate GR15           | ?                    | ?    |
| LdMNPV          | AF081810 | Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus                            | (Kuzio et al., 1999) | MNPV |
| LdMNPV 2161     | KF695050 | Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus isolate 2161      | (Kuzio et al., 1999) | MNPV |
| LdMNPV 27       | KP027546 | Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus isolate LdMNPV-27 | (Kuzio et al., 1999) | MNPV |

|                  |          |  |                           |      |
|------------------|----------|--|---------------------------|------|
| LdMNPV 3029      | KM386655 | Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus strain 3029   | (Kuzio et al., 1999)      | MNPV |
| LeseNPV AH1      | AY394490 | Leucania separata nuclear polyhedrosis virus strain AH1      | (Du et al., 2007)         | MNPV |
| LoobMNPV         | AF232690 | Lonomia obliqua multiple NPV                                 | (Wolff et al., 2002)      | MNPV |
| LyxyMNPV 5       | GQ202541 | Lymantria xyline MNPV isolate LyxyMNPV-5                     | (Nai et al., 2010)        | MNPV |
| MacoNPV A 90/2   | U59461   | Mamestra configurata NPV-A strain 90/2                       | (Erlandson, 1990)         | MNPV |
| MacoNPV A 90/4   | AF539999 | Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus A 90/4             | (Erlandson, 1990)         | MNPV |
| MacoNPV B        | AY126275 | Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus B                  | (Erlandson, 1990)         | MNPV |
| MaviMNPV         | EF125867 | Maruca vitrata MNPV  | (Lee et al., 2007)        | MNPV |
| MbMNPV CHb1      | JX138237 | Mamestra brassicae multiple nucleopolyhedrovirus strain CHb1 | (Erlandson, 1990)         | MNPV |
| MbMNPV CTa       | KJ871680 | Mamestra brassicae multiple nucleopolyhedrovirus isolate CTa | (Erlandson, 1990)         | MNPV |
| MbMNPV K1        | JQ798165 | Mamestra brassicae MNPV strain K1                            | (Erlandson, 1990)         | MNPV |
| NeabNPV          | DQ317692 | Neodiprion abietis nucleopolyhedrovirus                      | (Lucarotti et al., 2012)  | SNPV |
| NeleNPV          | AY349019 | Neodiprion lecontei NPV                                      | (Cunningham et al., 1984) | SNPV |
| NeseNPV          | AY430810 | Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus                     | (Federici, 1997)          | SNPV |
| OpMNPV           | U75930   | Orgyia pseudotsugata MNPV                                    | (Ahrens et al., 1997b)    | MNPV |
| OrleNPV I CFS 77 | EU309041 | Orgyia leucostigma NPV isolate CFS-77                        | (Thumbi et al., 2011)     | SNPV |
| PeluSNPV         | KM596836 | Perigonia lusca single nucleopolyhedrovirus                  | x                         | SNPV |
| PespNPV          | KM009991 | Peridroma alphabaculovirus isolate GR_167                    | x                         | MNPV |
| PhcyNPV          | JX404026 | Philosamia cynthia ricini nucleopolyhedrovirus virus         | x                         | MNPV |



|                 |          |  |                              |      |
|-----------------|----------|--|------------------------------|------|
| PhopGV          | AF499596 | Phthorimaea operculella granulovirus                             | G                            | GV   |
| PiraGV          | JX968491 | Pieris rapae granulovirus  | G                            | GV   |
| PiraGV E3       | GU111736 | Pieris rapae granulovirus strain E3                              | G                            | GV   |
| PiraGV SK       | GQ884143 | Pieris rapae granulovirus  | G                            | GV   |
| PlxyGV          | AF270937 | Plutella xylostella granulovirus genome                          | G                            | GV   |
| PlxyMNPV        | DQ457003 | Plutella xylostella multiple nucleopolyhedrovirus isolate CL3    | (Harrison and Lynn, 2007)    | MNPV |
| PsinSNPV-IE     | KJ631622 | Pseudoplusia includens SNPV IE                                   | (Craveiro et al., 2013)      | SNPV |
| PsunGV Hawaiiin | EU678671 | Pseudaletia unipuncta granulovirus strain Hawaiiin               | G                            | GV   |
| RoMNPV          | AY145471 | Rachiplusia ou multiple nucleopolyhedrovirus                     | (Harrison and Bonning, 2003) | MNPV |
| SeMNPV          | AF169823 | Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus complete genome           | (IJkel et al., 1999)         | MNPV |
| SeMNPV A11      | HG425343 | Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus isolate VT-SeA11 | (IJkel et al., 1999)         | MNPV |
| SeMNPV A12      | HG425344 | Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus isolate VT-SeA12 | (IJkel et al., 1999)         | MNPV |
| SeMNPV G24      | HG425346 | Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus isolate HT-SeG24 | (IJkel et al., 1999)         | MNPV |
| SeMNPV G25      | HG425347 | Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus isolate HT-SeG25 | (IJkel et al., 1999)         | MNPV |
| SeMNPV G26      | HG425348 | Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus isolate HT-SeG26 | (IJkel et al., 1999)         | MNPV |
| SeMNPV SP2A     | HG425349 | Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus isolate HT-      | (IJkel et al., 1999)         | MNPV |

| SeSP2A              |          |  |                            |      |
|---------------------|----------|--|----------------------------|------|
| SeMNPV VT SeOx4     | HG425345 | Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus isolate VT-SeOx4 | (IJkel et al., 1999)       | MNPV |
| SfMNPV G defective  | JF899325 | Spodoptera frugiperda MNPV genotype SfMNPV-G defective           | (Wolff et al., 2008)       | MNPV |
| SfMNPV I 3AP2       | EF035042 | Spodoptera frugiperda MNPV isolate 3AP2                          | (Wolff et al., 2008)       | MNPV |
| SfMNPV I Nicaraguan | HM595733 | Spodoptera frugiperda MNPV isolate Nicaraguan                    | (Wolff et al., 2008)       | MNPV |
| SfMNPV I19          | EU258200 | Spodoptera frugiperda MNPV isolate 19                            | (Wolff et al., 2008)       | MNPV |
| SIMNPV G2           | AF325155 | Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus strain G2                 | (Pang et al., 2001)        | MNPV |
| SpfrGV VG008        | KM371112 | Spodoptera frugiperda Betabaculovirus isolate VG008              | G                          | GV   |
| SpliGV SLGV K1      | DQ288858 | Spodoptera litura granulovirus isolate SIGV-K1                   | G                          | GV   |
| SpliNPV AN1956      | JX454574 | Spodoptera littoralis NPV isolate AN1956                         | (Breitenbach et al., 2013) | MNPV |
| SpliNPV II          | EU780426 | Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus II                        | (Pang et al., 2001)        | MNPV |
| SujuNPV             | KJ676450 | Sucra jujuba nucleopolyhedrovirus isolate 473                    | (Liu et al., 2014)         | SNPV |
| ThorMNPV            | JX467702 | Thysanoplusia orichalcea NPV isolate p2                          | (Wang et al., 2012)        | MNPV |
| TnSNPV              | DQ017380 | Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus                      | (Willis et al., 2005)      | SNPV |
| XcGV                | AF162221 | Xestia c-nigrum granulovirus genome                              | G                          | GV   |

## 5 DISCUSSÃO

Baculovírus são vírus de insetos caracterizados por possuírem dois fenótipos infectivos, um responsável pelo espalhamento horizontal do vírus, o ODV e outro responsável pelo espalhamento sistêmico da infecção, o BV. Curiosamente, ODVs de diferentes espécies de baculovirus do gênero *Alphabaculovirus* podem ser de dois tipos, SNPV ou MNPV. Os SNPVs possuem apenas um nucleocapsídeo por envelope, enquanto os MNPVs possuem vários. Essa diferença fenotípica foi utilizada por longo tempo como critério de classificação destes vírus, entretanto com o aumento de genomas sequenciados alguns pesquisadores argumentam que esta classificação não explica a filogenia. Apesar disso os termos MNPV e SNPV continuam sendo utilizados por tradição e por facilitar a identificação de isolados. Diversos genes quando deletados são capazes de alterar o fenótipo MNPV para SNPV. Por exemplo, os genes Ac23 (Yu et al., 2009), Ac43 (Tao et al., 2013), Ac78 (Li et al., 2014) e Ac92 (Wu and Passarelli, 2010) quando deletados do AcMNPV diminuíram a quantidade de nucleocapsídeos por ODV gerando um fenótipo quase SNPV ou SNPV. Além destes genes, o gene *dnapol* com uma mutação específica causa o mesmo efeito no envelopamento de capsídeos em ODVs (Feng et al., 2012). Tais genes, apesar de afetarem a capacidade de produzir MNPVs também modificaram outros aspectos da infecção de baculovírus, como por exemplo o Ac78 deletado produz BVs não infectivos (Li et al., 2014). Dessa maneira, a deleção desses genes não permite fazer experimentos evolutivos para comparação de MNPVs e SNPVs, uma vez que afetam outros fenótipos, não podendo também ser apontados como fatores genéticos responsáveis pelo surgimento do fenótipo MNPV, o Ac78 e a *dnapol* são core genes, isto é, estão presente em todos os baculovírus sequenciados até o momento. A base genética por trás destes fenótipos continua sem explicação e entendê-la permitirá avaliar melhor o impacto da múltipla oclusão de

nucleocapsídeos na evolução de baculovirus. Neste estudo, a evolução de SNPVs e MNPVs ao longo da filogenia de baculovirus foi investigada com objetivo de identificar potenciais genes relacionados com o envelopamento de múltiplos capsídeos no ODV.

Os ODVs de baculovirus dos gêneros *Gamma-* e *Deltabaculovirus* são SNPVs e os do gênero *Betabaculovirus*, apesar de não serem NPVs, apresentam apenas um nucleocapsídeo por envelope em seus ODVs. Isso sugere que o fenótipo MNPV é derivado enquanto o fenótipo SNPV é ancestral. Após uma extensa revisão bibliográfica, a análise da presença do fenótipo ao longo da filogenia dos baculovirus com genoma sequenciado revelou que os MNPVs não formam um único grupo monofilético, entretanto, é possível observar que existe uma associação filogenética e que o fenótipo não aparece de forma aleatória.

A comparação entre os genomas de vírus filogeneticamente relacionados com fenótipos distintos é uma boa maneira de tentar identificar a base genética para o surgimento do fenótipo MNPV. A comparação entre os genomas de BmNPV com os genomas de AcMNPV e BomaNPV revelou a perda do gene *p94* por parte do genoma do BmNPV. Nós reconstruímos a história filogenética do gene *p94* e modificamos geneticamente o vírus AcMNPV retirando o gene *p94* e recolocando novamente para avaliar se esta perda, que é a principal diferença entre os genomas comparados, é a responsável pela mudança de fenótipo de MNPV para SNPV.

A filogenia do gene *p94* juntamente com a comparação dos *loci* deste gene nos diferentes baculovirus que o possuem revelou que provavelmente ocorreram três entradas independentes deste gene em genomas de baculovirus. Além disso, a *p94* de *Betabaculovirus* é filogeneticamente mais próxima aos homólogos de *p94* encontrados em bracovirus, este resultado concorda com o proposto por (Kim and Hepat, 2015). Os

bracovirus são um tipo de vírus cujo DNA está integrado no genoma de algumas espécies de vespas e é transmitido verticalmente das vespas mães para as vespas filhas (Drezen et al., 2006). Baculovirus, bracovirus e um terceiro grupo de vírus derivam de um mesmo ancestral comum (Strand and Burke, 2012; Thézé et al., 2011). Partículas virais de bracovirus são produzidas apenas em células do ovário de vespas e são injetados em lagartas junto com os ovos das vespas, as quais que se desenvolvem dentro da lagarta. Alguns genes de bracovirus são, então, expressos em alguns tecidos das lagartas parasitadas pela vespa e possuem funções relacionadas à supressão do sistema imune da lagarta, além disso impedem que a lagarta entre no estágio de muda e se torne pupa (Kim and Hepat, 2015). Estes eventos auxiliam as larvas que se desenvolverão dentro da lagarta, existindo aí uma relação de mutualismo entre os bracovirus e as vespas.

Os bracovirus codificam 4 homólogos ao gene *p94*, estes genes atuam na supressão do sistema imune da lagarta impedindo a formação de nódulos de hemócitos que atuam contra infecções e, além disso, possuem importante papel impedindo que a larva se torne pupa (Kim and Hepat, 2015). Os baculovirus possuem outros genes capazes de impedir que a larva se torne pupa, como por exemplo o EGT (O'Reilly and Miller, 1989) e, talvez por isso, vírus com a *p94* deletada continuou capaz de impedir a lagarta de entrar em pupa, como observado em nosso trabalho.

Já foi mostrado que o RNA mensageiro de *p94* foi detectado nas fases iniciais da infecção por AcMNPV a partir de 6 h p.i. (Friesen and Miller, 1987), além disso, no trabalho que estudou o transcriptoma do AcMNPV também foram identificados transcritos referentes ao mRNA de *p94* na fase precoce de infecção (Chen et al., 2013). Apesar disso, a produção da proteína P94 nunca havia sido mostrada e nós identificamos pela primeira vez a expressão de P94 (fusionada ao peptídeo repórter HA)

e determinamos a sua cinética de produção. Por microscopia confocal, foi possível identificar que a proteína P94 começa a aparecer no citoplasma de células infectadas no tempo 6 h p.i. e a quantidade dela no citoplasma aumenta até 24 h p.i., tempo de expressão máxima, a partir daí a quantidade detectada começa a cair. Por Western blot só foi possível identificar a proteína a partir de 12 h p.i. e com pico de produção também às 24 h p.i.. Ou seja, existe um retardo entre os picos de produção de RNA mostrados no transcriptoma e a produção de proteína. Dessa forma, embora o mRNA de P94 seja caracterizado como pertencente à fase precoce e quantidades mínima de proteína sejam observadas nessa fase, a produção máxima de P94 só é observada já na fase tardia.

Além de determinarmos a cinética de expressão da P94, mostramos que a deleção completa do gene causa retardamento na produção de BVs, na replicação do DNA. Vale lembrar que na porção final do gene existe uma origem de replicação de DNA do tipo *non-hr ori* (do inglês, *non-homologous DNA replication origin*) (Kool et al., 1994), dessa forma o atraso na replicação do DNA e o consequente retardamento na produção de BVs possivelmente podem estar relacionados à retirada dessa *non-hr ori* e não à falta do produto proteico propriamente dito. Apesar disso, a deleção do gene *p94* parece afetar a produção de IE1, um importante transativador de genes em baculovirus, um evento da infecção celular não dependente da *non-hr ori*. Dessa maneira, genes importantes para a replicação do DNA podem estar sendo produzidos com atraso impactando assim a replicação do DNA e a consequente formação de BVs.

Quando a *p94* foi deletada pela primeira vez, nenhuma diferença foi observada na infectividade oral e no tempo de morte de lagartas das espécies *Spodoptera frugiperda* e *Trichopusia ni* infectadas com o vírus deletado em relação ao vírus controle (Friesen and Miller, 1987). Entretanto, nós observamos uma redução na

mortalidade de larvas *Chrysodeixis includens*. Este impacto pode ser explicado pela perda da *non-hr* ori ou em virtude da função da P94 ser mais importante na infecção de determinadas espécies do que em outras.

A região da P94 é conhecida por ser mantida em vírus defectivos que são formados quando o AcMNPV é replicado sucessivamente *in vitro* em cultura de células (Miller and Miller, 1982). A formação de vírus defectivos é um problema para o uso de baculovirus para expressão heteróloga de proteínas. Estes vírus defectivos perdem partes do genoma mantendo origens de replicação, ficam menores e capazes de replicar mais rápido, aumentando assim em frequência ao longo das passagens. Estes genomas costumam perder a parte codificante da proteína de interesse e a sua produção é então diminuída. O baculovirus *Spodoptera exigua* Multinucleopolyhedrovirus (SeMNPV) com deleção de uma *non-hr* ori de seu genoma se mostrou resistente contra a formação de vírus defectivos em cultura de célula. Dessa maneira, o vírus *p94* deletado construído neste trabalho pode ter grande potencial para produção heteróloga de proteínas e testes devem ser feitos para avaliar tal potencial.

Com o objetivo avaliar o impacto da deleção do gene *p94* seria capaz de modificar o fenótipo MNPV para SNPV analisamos células infectadas com o vírus *p94* deletado pela microscopia eletrônica de transmissão e observamos que a retirada desse gene não alterou o fenótipo do AcMNPV para SNPV. Além disso, apesar de todos os NPVs que possuem *p94* serem MNPVs a recíproca não é verdadeira e o gene *p94* não está presente em todos os baculovirus com fenótipo MNPV. Isso nos leva a acreditar que a sua perda no BmNPV não foi a responsável pelo seu fenótipo SNPV e que talvez a mudança de hospedeiro seja o um fator limitante para a produção de MNPV. Dessa maneira é possível concluir que a explicação genética para o envelopamento de múltiplos capsídeos observado em alguns baculovirus é muito mais complexa do que a

simples perda ou aquisição de um gene. Possivelmente a formação de ODVs com múltiplos nucleocapsídeos pode estar relacionada a múltiplos fatores e pode ser hospedeiro-específico, uma vez que o vírus BomaNPV pode assumir um ou outro fenótipo dependendo da célula que está infectando (Xu et al., 2012).

Para concluir, o trabalho apresentado nesta dissertação gerou novas informações a respeito da P94, mostrando que esta proteína é expressa em fases iniciais da infecção, com acumulação máxima a 24 h p.i. e está localizada no citoplasma celular. Além disso, a deleção da sua região codificadora completa do vírus AcMNPV causa atraso na replicação do DNA viral e na produção de BVs, uma diminuição na quantidade de poliedros produzidos *in vitro*, além de afetar a letalidade *in vivo*, isto é, a capacidade de causar morte no hospedeiro, do vírus. Além disso, apesar de a sua perda em BmNPV (SNPV) ser a principal diferença entre BmNPV e aqueles que são os vírus filogeneticamente mais próximos (BomaNPV e MNPV) e que são SNPVs, a P94 não é responsável pelo fenótipo MNPV, e a sua deleção não altera o fenótipo para SNPV.



## 6 BIBLIOGRAFIA

Ahrens, C.H., Russell, R.L.Q., Funk, C.J., Evans, J.T., Harwood, S.H., and Rohrmann, G.F. (1997a). The Sequence of the *Orgyia pseudotsugata* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus Genome. *Virology* 229, 381–399.

Ahrens, C.H., Russell, R.L., Funk, C.J., Evans, J.T., Harwood, S.H., and Rohrmann, G.F. (1997b). The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 229, 381–399.

Allaway, G.P., and Payne, C.C. (1983). A biochemical and biological comparison of three European isolates of nuclear polyhedrosis viruses from *Agrotis segetum*. *Arch. Virol.* 75, 43–54.

Allen, Knell, G.E. and, and D, J. (1977). A Nuclear Polyhedrosis Virus of *Anticarsia Gemmatalis*: I. Ultrastructure, Replication, and Pathogenicity. *Fla. Entomol.* 60, 233–240.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J.-F., Dessimoz, C., and Gascuel, O. (2011). Survey of Branch Support Methods Demonstrates Accuracy, Power, and Robustness of Fast Likelihood-based Approximation Schemes. *Syst. Biol.* syr041.

Ardisson-Araújo, D.M., Sosa-Gomez, D.R., Melo, F.L., Bão, S.N., and Ribeiro, B.M. (2015). Characterization of *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus isolated in Brazil during the first old world bollworm (*Noctuidae*: *Helicoverpa armigera*) nationwide outbreak. *Virus Rev. Res.* 20, 2.

Ardisson-Araújo, D.M.P., Morgado, F.D.S., Schwartz, E.F., Corzo, G., and Ribeiro, B.M. (2013). A New theraphosid Spider Toxin Causes Early Insect Cell Death by Necrosis When Expressed In Vitro during Recombinant Baculovirus Infection. *PLoS ONE* 8, e84404.

Ardisson-Araújo, D.M.P., Melo, F.L., de Souza Andrade, M., Brancalhão, R.M.C., Bão, S.N., and Ribeiro, B.M. (2014). Complete genome sequence of the first non-Asian isolate of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 49, 477–484.

Au, S., Wu, W., and Panté, N. (2013). Baculovirus Nuclear Import: Open, Nuclear Pore Complex (NPC) Sesame. *Viruses* 5, 1885–1900.

Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., and Possee, R.D. (1994). The Complete DNA Sequence of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology* 202, 586–605.

Barrionuevo, M.J., Murúa, M.G., Goane, L., Meagher, R., and Navarro, F. (2012). Life Table Studies of *Rachiplusia nu* (Guenée) and *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *Includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) on Artificial Diet. *Fla. Entomol.* 95, 944–951.

Blissard, G.W., and Rohrmann, G.F. (1989). Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 170, 537–555.

Boughton, null, Harrison, null, Lewis, null, and Bonning, null (1999). Characterization of a nucleopolyhedrovirus from the black cutworm, *agrotis ipsilon* (Lepidoptera: noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 74, 289–294.

Breitenbach, J.E., El-Sheikh, E.-S.A., Harrison, R.L., Rowley, D.L., Sparks, M.E., Gundersen-Rindal, D.E., and Popham, H.J.R. (2013). Determination and analysis of the genome sequence of *Spodoptera littoralis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.* *171*, 194–208.

Brown, S.P., Hochberg, M.E., and Grenfell, B.T. (2002). Does multiple infection select for raised virulence? *Trends Microbiol.* *10*, 401–405.

Castro, M.E.B., Ribeiro, Z.M.A., Santos, A.C.B., Souza, M.L., Machado, E.B., Sousa, N.J., and Moscardi, F. (2009). Identification of a new nucleopolyhedrovirus from naturally-infected *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) larvae on poplar plantations in South Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* *102*, 149–154.

Chen, X., Zhang, W.-J., Wong, J., Chun, G., Lu, A., McCutchen, B.F., Presnail, J.K., Herrmann, R., Dolan, M., Tingey, S., et al. (2002). Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.* *83*, 673–684.

Chen, Y.-R., Zhong, S., Fei, Z., Hashimoto, Y., Xiang, J.Z., Zhang, S., and Blissard, G.W. (2013). The Transcriptome of the Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* Cells. *J. Virol.* *87*, 6391–6405.

Choi, J., and Guarino, L.A. (1995). The baculovirus transactivator IE1 binds to viral enhancer elements in the absence of insect cell factors. *J. Virol.* *69*, 4548–4551.

Clavijo, G., Williams, T., Muñoz, D., López-Ferber, M., and Caballero, P. (2009). Entry into midgut epithelial cells is a key step in the selection of genotypes in a nucleopolyhedrovirus. *Virol. Sin.* *24*, 350–358.

Clem, R.J., Robson, M., and Miller, L.K. (1994). Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene p35 and the adjacent gene p94. *J. Virol.* *68*, 6759–6762.

Cory, J.S., and Bishop, D.H.L. (1997). Use of baculoviruses as biological insecticides. *Mol. Biotechnol.* *7*, 303–313.

Craveiro, S.R., Melo, F.L., Ribeiro, Z.M.A., Ribeiro, B.M., Bao, S.N., Inglis, P.W., and Castro, M.E.B. (2013). *Pseudoplusia includens* single nucleopolyhedrovirus: genetic diversity, phylogeny and hypervariability of the pif-2 gene. *J. Invertebr. Pathol.* *114*, 258–267.

Cunningham, J.C., de Groot, P., and McPhee, J.R. (1984). Lecontvirus: a viral insecticide for control of redheaded pine sawfly, *Neodiprion lecontei*. FPMI Technical Note 2. 2.

Detvisitsakun, C., Berretta, M.F., Lehiy, C., and Passarelli, A.L. (2005). Stimulation of cell motility by a viral fibroblast growth factor homolog: proposal for a role in viral pathogenesis. *Virology* *336*, 308–317.

Drezen, J.-M., Bezier, A., Lesobre, J., Huguet, E., Cattolico, L., Periquet, G., and Dupuy, C. (2006). The few virus-like genes of *Cotesia congregata* bracovirus. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *61*, 110–122.

Du, E.Q., Yan, F., Jin, W.X., Lu, N., Xiao, H.Z., Lu, S.Y., and Qi, Y.P. (2007). P13 of *Leucania separata* multiple nuclear polyhedrosis virus affected the polyhedra and budded virions yields of AcMNPV. *Virus Res.* *124*, 160–167.

Engelhard, E.K., Kam-Morgan, L.N., Washburn, J.O., and Volkman, L.E. (1994). The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3224–3227.

Erlanson, M.A. (1990). Biological and biochemical comparison of *Mamestra configurata* and *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus isolates pathogenic for the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* *56*, 47–56.

Fan, Q., Li, S., Wang, L., Zhang, B., Ye, B., Zhao, Z., and Cui, L. (2007). The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. *Virology* *366*, 304–315.

Federici, B.A. (1997). Baculovirus Pathogenesis. In *The Baculoviruses*, L.K. Miller, ed. (Springer US), pp. 33–59.

Feng, G., Thumbi, D.K., Jong, J. de, Hodgson, J.J., Arif, B.M., Doucet, D., and Krell, P.J. (2012). Selection and Characterization of *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus DNA Polymerase Mutations. *J. Virol.* *86*, 13576–13588.

Friesen, P.D., and Miller, L.K. (1987). Divergent transcription of early 35- and 94-kilodalton protein genes encoded by the HindIII K genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* *61*, 2264–2272.

Gettig, R.R., and McCarthy, W.J. (1982). Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis* spp nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. *Virology* *117*, 245–252.

Granados, R.R., and Lawler, K.A. (1981). In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108, 297–308.

Grant, J.R., Arantes, A.S., and Stothard, P. (2012). Comparing thousands of circular genomes using the CGView Comparison Tool. *BMC Genomics* 13, 202.

Hajós, J.P., Pijnenburg, J., Usmany, M., Zuidema, D., Závodszy, P., and Vlak, J.M. (2000). High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture. *Arch. Virol.* 145, 159–164.

Harrison, R.L., and Bonning, B.C. (2003). Comparative analysis of the genomes of *Rachiplusia ou* and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.* 84, 1827–1842.

Harrison, R.L., and Lynn, D.E. (2007). Genomic sequence analysis of a nucleopolyhedrovirus isolated from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Virus Genes* 35, 857–873.

Herniou, E., and Jehle, J. (2007). Baculovirus Phylogeny and Evolution. *Curr. Drug Targets* 8, 1043–1050.

Hilton, S., and Winstanley, D. (2008). Genomic sequence and biological characterization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the summer fruit tortrix, *Adoxophyes orana*. *J. Gen. Virol.* 89, 2898–2908.

Hitchman, R.B., Possee, R.D., and King, L.A. (2009). Baculovirus Expression Systems for Recombinant Protein Production in Insect Cells. *Recent Pat. Biotechnol.* 3, 46–54.

Hu, Z.H., Liu, M.F., Jin, F., Wang, Z.X., Liu, X.Y., Li, M.J., Liang, B.F., and Xie, T.E. (1993). Nucleotide sequence of the *Buzura suppressaria* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene. *J. Gen. Virol.* *74* ( Pt 8), 1617–1620.

Hughes, K.M. (1950a). A DEMONSTRATION OF THE NATURE OF POLYHEDRA USING ALKALINE SOLUTIONS<sup>1</sup>. *J. Bacteriol.* *59*, 189–195.

Hughes, K.M. (1950b). A DEMONSTRATION OF THE NATURE OF POLYHEDRA USING ALKALINE SOLUTIONS<sup>1</sup>. *J. Bacteriol.* *59*, 189–195.

Hughes, K.M. (1978). The macromolecular lattices of polyhedra. *J. Invertebr. Pathol.* *31*, 217–224.

Hughes, K.M., and Addison, R.B. (1970). Two nuclear polyhedrosis viruses of the Douglas-fir tussock moth. *J. Invertebr. Pathol.* *16*, 196–204.

Hyink, O., Dellow, R.A., Olsen, M.J., Caradoc-Davies, K.M.B., Drake, K., Herniou, E.A., Cory, J.S., O'Reilly, D.R., and Ward, V.K. (2002). Whole genome analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* *83*, 957–971.

IJkel, W.F., van Strien, E.A., Heldens, J.G., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R.W., and Vlak, J.M. (1999). Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen. Virol.* *80* ( Pt 12), 3289–3304.

Ikeda, M., Shikata, M., Shirata, N., Chaeychomsri, S., and Kobayashi, M. (2006). Gene organization and complete sequence of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen. Virol.* *87*, 2549–2562.

Imai, N., Kang, W., Iwabuchi, K., Sato, K., and Maeda, S. (2000). Analysis of interaction between molecules of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus IE-2 using a yeast two-hybrid system. *Acta Virol.* 44, 199–202.

Jakubowska, A., Oers, M.M. van, Otvos, I.S., and Vlak, J.M. (2007). Phylogenetic analysis of *Orgyia pseudotsugata* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Viol. Sin.* 22, 257–265.

Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M., and Vlak, J.M. (2006a). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* 151, 1257–1266.

Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M., and Vlak, J.M. (2006b). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* 151, 1257–1266.

Ji, X., Sutton, G., Evans, G., Axford, D., Owen, R., and Stuart, D.I. (2010). How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. *EMBO J.* 29, 505–514.

de Jong, J.G., Lauzon, H.A.M., Dominy, C., Poloumienko, A., Carstens, E.B., Arif, B.M., and Krell, P.J. (2005). Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 86, 929–943.

Kamita, S.G., Maeda, S., and Hammock, B.D. (2003). High-Frequency Homologous Recombination between Baculoviruses Involves DNA Replication. *J. Virol.* 77, 13053–13061.



Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 28, 1647–1649.

Keddie, B.A., Aponte, G.W., and Volkman, L.E. (1989). The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243, 1728–1730.

Kikhno, I., Gutiérrez, S., Croizier, L., Croizier, G., and Ferber, M.L. (2002). Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* 83, 3013–3022.

Kim, Y., and Hapat, R. (2015). Baculoviral p94 homologs encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppress both immunity and development of the diamondback moth, *Plutellae xylostella*. *Insect Sci.*

Kool, M., Goldbach, R.W., and Vlak, J.M. (1994). A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 75, 3345–3352.

Krzywinski, M.I., Schein, J.E., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S.J., and Marra, M.A. (2009). Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.*

Kuzio, J., Pearson, M.N., Harwood, S.H., Funk, C.J., Evans, J.T., Slavicek, J.M., and Rohrmann, G.F. (1999). Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* 253, 17–34.

Lee, S.-T., Srinivasan, R., Wu, Y.-J., and Talekar, N.S. (2007). Occurrence and characterization of a nucleopolyhedrovirus from *Maruca vitrata* (Lepidoptera, Pyralidae) isolated in Taiwan. *BioControl* 52, 801–819.

Lepore, L.S., Roelvink, P.R., and Granados, R.R. (1996). Enhancin, the Granulosis Virus Protein That Facilitates Nucleopolyhedrovirus (NPV) Infections, Is a Metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.* 68, 131–140.

Li, S.-N., Wang, J.-Y., Yuan, M.-J., and Yang, K. (2014). Disruption of the baculovirus core gene ac78 results in decreased production of multiple nucleocapsid-enveloped occlusion-derived virions and the failure of primary infection in vivo. *Virus Res.* 191, 70–82.

Li, Z., Li, C., Yang, K., Wang, L., Yin, C., Gong, Y., and Pang, Y. (2003). Characterization of a chitin-binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.* 96, 113–122.

Liu, K., Linder, C.R., and Warnow, T. (2011). RAxML and FastTree: Comparing Two Methods for Large-Scale Maximum Likelihood Phylogeny Estimation. *PLoS ONE* 6, e27731.

Liu, X., Yin, F., Zhu, Z., Hou, D., Wang, J., Zhang, L., Wang, M., Wang, H., Hu, Z., and Deng, F. (2014). Genomic sequencing and analysis of *Sucra jujuba* nucleopolyhedrovirus. *PloS One* 9, e110023.

Long, G., Pan, X., Kormelink, R., and Vlak, J.M. (2006). Functional Entry of Baculovirus into Insect and Mammalian Cells Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* *80*, 8830–8833.

López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., and Caballero, P. (2003). Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *270*, 2249–2255.

Lucarotti, C.J., Whittome-Waygood, B.H., Lapointe, R., e, Morin, B., Levin, D.B., Lucarotti, C.J., Whittome-Waygood, B.H., Lapointe, R., e, et al. (2012). Pathology of a Gammabaculovirus in Its Natural Balsam Fir Sawfly (*Neodiprion abietis*) Host, Pathology of a Gammabaculovirus in Its Natural Balsam Fir Sawfly (*Neodiprion abietis*) Host. *Psyche J. Entomol.* *2012*, *2012*, e646524.

Ma, X., Xu, H.-J., Tang, M.-J., Xiao, Q., Hong, J., and Zhang, C.-X. (2006). Morphological, phylogenetic and biological characteristics of *Ectropis obliqua* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *J. Microbiol. Seoul Korea* *44*, 77–82.

Means, J.C., and Passarelli, A.L. (2010). Viral fibroblast growth factor, matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 9825–9830.

Miller, D.W., and Miller, L.K. (1982). A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element. *Nature* *299*, 562–564.

Monsma, S.A., Oomens, A.G., and Blissard, G.W. (1996). The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J. Virol.* *70*, 4607–4616.

Moser, B.A., Becnel, J.J., White, S.E., Afonso, C., Kutish, G., Shanker, S., and Almira, E. (2001). Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. *J. Gen. Virol.* 82, 283–297.

Muñoz, D., Vlak, J.M., and Caballero, P. (1997). In vivo recombination between two strains of the genus Nucleopolyhedrovirus in its natural host, *Spodoptera exigua*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3025–3031.

Nagamine, T., Saito, T., Osada, H., and Matsumoto, S. (2015). Dissection of two modes of IE1 sub-nuclear localization in baculovirus-infected cells. *Virus Res.* 208, 120–128.

Nai, Y.-S., Wu, C.-Y., Wang, T.-C., Chen, Y.-R., Lau, W.-H., Lo, C.-F., Tsai, M.-F., and Wang, C.-H. (2010). Genomic sequencing and analyses of *Lymantria xyli* multiple nucleopolyhedrovirus. *BMC Genomics* 11, 116.

Nakai, M., Goto, C., Kang, W., Shikata, M., Luque, T., and Kunimi, Y. (2003). Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*. *Virology* 316, 171–183.

Nobiron, I., O'Reilly, D.R., and Olszewski, J.A. (2003). *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* cells: a global analysis of host gene regulation during infection, using a differential display approach. *J. Gen. Virol.* 84, 3029–3039.

van Oers, M.M., Abma-Henkens, M.H.C., Herniou, E.A., de Groot, J.C.W., Peters, S., and Vlak, J.M. (2005). Genome sequence of *Chrysodeixis chalcites*

nucleopolyhedrovirus, a baculovirus with two DNA photolyase genes. *J. Gen. Virol.* 86, 2069–2080.

O'Reilly, D.R., and Miller, L.K. (1989). A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* 245, 1110–1112.

O'Reilly, D.R., Miller, L.K., and Luckow, V.A. (1994). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual* (Oxford University Press).

Pang, Y., Yu, J., Wang, L., Hu, X., Bao, W., Li, G., Chen, C., Han, H., Hu, S., and Yang, H. (2001). Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* 287, 391–404.

Parker, J., Rambaut, A., and Pybus, O.G. (2008). Correlating viral phenotypes with phylogeny: accounting for phylogenetic uncertainty. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 8, 239–246.

Pearson, M.N., Groten, C., and Rohrmann, G.F. (2000). Identification of the *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Envelope Fusion Protein Provides Evidence for a Phylogenetic Division of the Baculoviridae. *J. Virol.* 74, 6126–6131.

Peng, J., Zhong, J., and R. Granados, R. (1999). A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.* 45, 159–166.

Pijlman, G.P., Dortmans, J.C.F.M., Vermeesch, A.M.G., Yang, K., Martens, D.E., Goldbach, R.W., and Vlak, J.M. (2002). Pivotal Role of the Non-hr Origin of DNA Replication in the Genesis of Defective Interfering Baculoviruses. *J. Virol.* 76, 5605–5611.

Possee, R.D., and Howard, S.C. (1987). Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res.* *15*, 10233–10248.

Quant, R.L., Pearson, M.N., Rohrmann, G.F., and Beaudreau, G.S. (1984). Production of polyhedrin monoclonal antibodies for distinguishing two *Orgyia pseudotsugata* baculoviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* *48*, 732–736.

Rohrmann, G.F. (1986). Polyhedrin Structure. *J. Gen. Virol.* *67*, 1499–1513.

Rohrmann, G.F. (2013a). *Baculovirus Molecular Biology: Third Edition* (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)).

Rohrmann, G.F. (2013b). *Baculovirus Molecular Biology: Third Edition* (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)).

Rohrmann, G.F. (2014a). Baculovirus nucleocapsid aggregation (MNPV vs SNPV): an evolutionary strategy, or a product of replication conditions? *Virus Genes*.

Rohrmann, G.F. (2014b). Baculovirus nucleocapsid aggregation (MNPV vs SNPV): an evolutionary strategy, or a product of replication conditions? *Virus Genes* *49*, 351–357.

Rohrmann, G.F., Melgaard, S., Beaudreau, G.S., and Martignoni, M.E. (1982). Characterization of DNA from three nuclear polyhedrosis viruses pathogenic for *Choristoneura* sp. *J. Invertebr. Pathol.* *40*, 237–241.

Saarinen, M.A., Troutner, K.A., Gladden, S.G., Mitchell-Logean, C.M., and Murhammer, D.W. (1999). Recombinant protein synthesis in *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 insect cell aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* *63*, 612–617.

Shi, Y., Li, K., Tang, P., Li, Y., Zhou, Q., Yang, K., and Zhang, Q. (2015). Three-dimensional visualization of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virion envelopment process gives new clues as to its mechanism. *Virology* 476, 298–303.

Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., and Caballero, P. (2004). Genetic Structure of a *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus Population: High Prevalence of Deletion Genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5579–5588.

Slavicek, J.M., and Popham, H.J.R. (2005). The *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Enhancers Are Components of Occlusion-Derived Virus. *J. Virol.* 79, 10578–10588.

Strand, M.R., and Burke, G.R. (2012). Polydnviruses as Symbionts and Gene Delivery Systems. *PLoS Pathog* 8, e1002757.

Takahashi, N., Yoshikura, H., and Kobayashi, I. (2003). An *Escherichia coli* strain, BJ5183, that shows highly efficient conservative (two-progeny) DNA double-strand break repair of restriction breaks. *Gene* 303, 89–97.

Tang, X.-D., Xiao, Q., Ma, X.-C., Zhu, Z.-R., and Zhang, C.-X. (2009). Morphology and genome of *Euproctis pseudoconsersa* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 38, 495–506.

Tao, X.Y., Choi, J.Y., Wang, Y., Roh, J.Y., Lee, J.H., Liu, Q., Park, J.B., Kim, J.S., Kim, W., and Je, Y.H. (2013). Functional characterization of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ORF43 and phenotypic changes of ORF43-knockout mutant. *J. Microbiol.* 51, 515–521.

Thézé, J., Bézier, A., Periquet, G., Drezen, J.-M., and Herniou, E.A. (2011). Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 15931–15935.

Thumbi, D.K., Eveleigh, R.J.M., Lucarotti, C.J., Lapointe, R., Graham, R.I., Pavlik, L., Lauzon, H.A.M., and Arif, B.M. (2011). Complete Sequence, Analysis and Organization of the *Orgyia leucostigma* Nucleopolyhedrovirus Genome. *Viruses* *3*, 2301–2327.

Vanarsdall, A.L., Okano, K., and Rohrmann, G.F. (2005). Characterization of the replication of a baculovirus mutant lacking the DNA polymerase gene. *Virology* *331*, 175–180.

Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., and McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insectspodoptera *frugiperda* (lepidoptera; noctuidae). *In Vitro* *13*, 213–217.

Wang, Y.-S., Huang, G.-H., Cheng, X.-H., Wang, X., Garretson, T.A., Dai, L.-Y., Zhang, C.-X., and Cheng, X.-W. (2012). Genome of *Thysanoplusia orichalcea* multiple nucleopolyhedrovirus lacks the superoxide dismutase gene. *J. Virol.* *86*, 11948–11949.

Washburn, J.O., Lyons, E.H., Haas-Stapleton, E.J., and Volkman, L.E. (1999a). Multiple Nucleocapsid Packaging of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Accelerates the Onset of Systemic Infection in *Trichoplusia ni*. *J. Virol.* *73*, 411–416.

Washburn, J.O., Lyons, E.H., Haas-Stapleton, E.J., and Volkman, L.E. (1999b). Multiple Nucleocapsid Packaging of *Autographa californica*



Nucleopolyhedrovirus Accelerates the Onset of Systemic Infection in *Trichoplusia ni*. *J. Virol.* 73, 411–416.

Washburn, J.O., Trudeau, D., Wong, J.F., and Volkman, L.E. (2003). Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the “M” and “S” strategies for establishing fatal infection. *J. Gen. Virol.* 84, 343–351.

Whitby, P.W., Morton, D.J., and Stull, T.L. (1998). Construction of antibiotic resistance cassettes with multiple paired restriction sites for insertional mutagenesis of *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 158, 57–60.

Willis, L.G., Seipp, R., Siepp, R., Stewart, T.M., Erlandson, M.A., and Theilmann, D.A. (2005). Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene. *Virology* 338, 209–226.

Wolff, J.L.C., Moraes, R.H.P., Kitajima, E., de Souza Leal, E., and de A Zanotto, P.M. (2002). Identification and characterization of a baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *J. Invertebr. Pathol.* 79, 137–145.

Wolff, J.L.C., Valicente, F.H., Martins, R., Oliveira, J.V. de C., and Zanotto, P.M. de A. (2008). Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.* 89, 1202–1211.

Wu, W., and Passarelli, A.L. (2010). *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Ac92 (ORF92, P33) Is Required for Budded Virus Production

and Multiply Enveloped Occlusion-Derived Virus Formation. *J. Virol.* *84*, 12351–12361.

Wu, W., Lin, T., Pan, L., Yu, M., Li, Z., Pang, Y., and Yang, K. (2006). *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Nucleocapsid Assembly Is Interrupted upon Deletion of the 38K Gene. *J. Virol.* *80*, 11475–11485.

Xu, Y.-P., Gu, L.-Z., Lou, Y.-H., Cheng, R.-L., Xu, H.-J., Wang, W.-B., and Zhang, C.-X. (2012). A baculovirus isolated from wild silkworm encompasses the host ranges of *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in cultured cells. *J. Gen. Virol.* *93*, 2480–2489.

Yang, S., and Miller, L.K. (1999). Activation of Baculovirus Very Late Promoters by Interaction with Very Late Factor 1. *J. Virol.* *73*, 3404–3409.

Yang, M., Li, M., Wang, Y., Qu, L., Huai, K., Nie, X., Qiao, L., Ding, J., and Zhang, Y. (2011). Virulence and characteristics of a new nucleopolyhedrovirus strain of *Dendrolimus kikuchii* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Afr J Microbiol Res* *5*, 2261–2265.

Young, J.C., MacKinnon, E.A., and Faulkner, P. (1993). The Architecture of the Virogenic Stroma in Isolated Nuclei of *Spodoptera frugiperda* Cells in Vitro Infected by *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Struct. Biol.* *110*, 141–153.

Yu, I.-L., Bray, D., Lin, Y.-C., and Lung, O. (2009). *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ORF 23 null mutant produces occlusion-derived virions with fewer nucleocapsids. *J. Gen. Virol.* *90*, 1499–1504.

Zhu, S.-Y., Yi, J.-P., Shen, W.-D., Wang, L.-Q., He, H.-G., Wang, Y., Li, B., and Wang, W.-B. (2009). Genomic sequence, organization and characteristics of a new nucleopolyhedrovirus isolated from *Clanis bilineata* larva. *BMC Genomics* 10, 91.

Zwart, M.P., Hemerik, L., Cory, J.S., Visser, J.A.G.M. de, Bianchi, F.J.J.A., Oers, M.M.V., Vlak, J.M., Hoekstra, R.F., and Werf, W.V. der (2009). An experimental test of the independent action hypothesis in virus–insect pathosystems. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* rspb.2009.0064.