



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**CONSTRUÇÃO DE CLONE INFECCIOSO E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE NOVOS ISOLADOS DE *PEPPER RINGSPOT VIRUS***

**ADRIANA RIBEIRO SILVA BATISTA**

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Brasília, 2013.



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**CONSTRUÇÃO DE CLONE INFECCIOSO E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE NOVOS ISOLADOS DE *PEPPER RINGSPOT VIRUS***

**ADRIANA RIBEIRO SILVA BATISTA**

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Tese 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 Doutora em Biologia Molecular.

Brasília, 2013.



Tese da autoria de Adriana Ribeiro Silva Batista, intitulada “**CONSTRUÇÃO DE CLONE INFECCIOSO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOVOS ISOLADOS DE *PEPPER RINGSPOT VIRUS***”, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em 20 de Dezembro de 2012, com menção e aprovação pela banca examinadora abaixo assinada:

Banca Examinadora

**Dr. Tatsuya Nagata (orientador)** - Professor do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília

**Dr. Renato de Oliveira Resende (examinador interno)** - Professor do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília

**Dra. Rita Carvalho (examinador interno)** - Professora do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília

**Dra. Mirtes Freitas Lima (Examinadora externa)** - Pesquisadora da Embrapa Hortaliças

**Dr. Cícero Nicolini (Examinador externo)** - Colaborador do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília

Brasília, 2013

*“Ao meu precioso Deus,  
fonte de toda minha força e decisão,  
À minha mãe, Maricélia, elo do meu conforto e do meu amor;  
Ao pai, Antônio Luiz, meu Norte e Sul;  
Ao meu esposo, Tiago pelo carinho e confiança;  
Ao meu filho, Iago Davi, que eu tanto amo”.*

Dedico

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, amigo fiel e companheiro de todas as horas.

Agradeço a minha mãe pela confiança, dedicação e atenção nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu pai pelo carinho e atenção.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos dos laboratórios pela credibilidade, pelas palavras de incentivo, pelo carinho. Em especial, a Carol e a Franciele, amigas, confidentes e companheiras.

Agradeço ao meu querido esposo Tiago pelas palavras de apoio, por sempre acreditar que eu conseguiria e que muitas vezes precisou suportar meu mau humor nos momentos “não tão bons”, as inúmeras horas na frente do computador ou os finais de semana no laboratório.

Agradeço ao amor da minha vida, meu filho Iago Davi, hoje com 1 ano e oito meses, que mesmo tão pequeno e inofensivo, já se mostra como um guerreiro. As minhas sinceras desculpas, por não participar do seu primeiro passo, por não ver o seu primeiro dentinho ou mesmo escutar a sua primeira palavra, Mamm!!! Mas eu sei que, mesmo distante, durante esses momentos, era eu quem estava em seu coração.

Agradeço ao meu orientador Dr. Tatsuya Nagata pela oportunidade oferecida, pela confiança, atenção e compreensão e, além disso, pelo exemplo de profissionalismo e de amigo. O meu Obrigada!!!

À Capes, pela concessão da bolsa de pesquisa.

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Biologia Celular pela oportunidade de realizar o doutorado.

*“No meio do caminho tinha uma pedra  
Tinha uma pedra no meio do caminho  
Nunca me esquecerei desse acontecimento  
na vida de minhas retinas tão fatigadas.”.*

**Carlos Drummond de Andrade**

*“E ainda que tivesse o dom de profecia,  
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,  
e ainda que tivesse toda a fé,  
de maneira tal que transportasse os montes,  
e não tivesse amor, nada seria.”*

**Coríntios 13:2**

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ÍNDICE DE TABELAS .....	XIII
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS UTILIZADOS.....	XIV
RESUMO .....	XV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUÇÃO .....	17
CAPÍTULO I .....	22
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1. Família <i>Virgaviridae</i> .....	22
2. O gênero <i>Tobravirus</i> .....	23
3. Transmissão e o ciclo de infecção do <i>Tobravirus</i> .....	25
4. Organização genômica de <i>TOBRAVIRUS</i> .....	26
5. Áreas de pesquisa em <i>Tobravirus</i> .....	29
6. <i>Tobravirus</i> como vetores de expressão ou indutores de silenciamento gênico .....	29
JUSTIFICATIVA .....	32
OBJETIVOS .....	33
CAPÍTULO II.....	34
DESENVOLVIMENTO DO cDNA DO ISOLADO CAM DE PepRSV COM ATRIBUIÇÕES INFECTIVAS VIA <i>AGROBACTERIUM</i> .....	34
1. Introdução .....	35
2. Materiais e Métodos .....	37
2.1. Modificação do vetor binário <i>pCAMBIA</i> .....	37
2.2. Isolado viral e plantas utilizadas .....	37
2.3. Síntese de oligonucleotídeos .....	40
2.4. Extração do RNA total isolado do CAM de <i>PepRSV</i> .....	41

2.5. Síntese do cDNA viral e amplificação .....	41
2.6. Análise das sequências do cDNA do isolado CAM.....	42
2.7. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	42
2.8. Modificação do cDNA de CAM a partir da inserção do promotor 35S CaMV e da ribozima .....	42
2.9. Adequações nucleotídicas em cDNA CAM modificado pela inserção de um promotor e uma ribozima para atribuir capacidade de infecção via <i>Agrobacterium</i> em plantas hospedeiras .....	47
<b>3. Resultados .....</b>	<b>51</b>
3.1. Desenvolvimento de Oligonucleotídeos internos para o RNA1 .....	51
3.2. Amplificação e clonagem do cDNA genômico do isolado CAM de PepRSV .....	51
3.3. Análise das sequências do cDNA do isolado CAM de PepRSV .....	53
3.4. Modificação cDNA RNA2 via PCR.....	53
3.5. Modificação cDNA RNA1 via PCR e recuperando o fragmento inteiro de RNA1 do isolado CAM.....	56
3.6. Atribuições infectivas ao cDNA do isolado CAM.....	61
<b>4. Discussão .....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>66</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOIS NOVOS ISOLADOS DE PepRSV.....</b>	<b>66</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>67</b>
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>69</b>
2.1. Isolado viral e condições de manutenção .....	69
2.2. Extração do RNA total.....	69
2.3. Síntese do cDNA viral e amplificação de Pivo 4 e Lavrinha.....	69
2.4. Sequenciamento do RNA2 dos dois isolados novos de tomateiro de PepRSV .....	70
<b>3. Resultados .....</b>	<b>71</b>
3.1. Análise de RT-PCR e detecção de RNAs .....	71
3.2. Sequenciamento de RNA2 dos novos isolados de PepRSV .....	71



<b>4. Discussão .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>85</b>
<i>1. Análise nucleotídica dos isolados Pivo 4, Lavrinha e CAM.....</i>	<i>85</i>
<i>2. Alinhamento múltiplo entre as sequências acima adquiridas.....</i>	<i>88</i>
<i>3. Análise de constituição de aminoácidos.....</i>	<i>91</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Apresentação das partículas virais de <i>Pepper ringspot virus</i> PepRSV. Partículas negativamente contrastadas com fosfotungstato a 2%. Barra representa 100 nm. Descrição de vírus de planta (DPV) <a href="http://www.dpvweb.net">http://www.dpvweb.net</a> . ....	17
Figura 2. Sintomas de mancha anular em tomateiro e formação de folhas enrugadas causadas pelo <i>Pepper ringspot virus</i> Isolado Lavrinha detectado no município de Luziânia - GO.....	18
Figura 3. Micrografia de partículas do nome por extenso PepRSV associadas às mitocôndrias. M=mitocôndria, L= partícula longa, C= partícula curta. Fonte: Kitajima e Costa, 1969). ....	19
Figura 4. Organização genômica de um <i>Tobravirus</i> (TRV). A. Representação esquemática da composição dos segmentos de 180-215 e 46-115nm de comprimento por 22nm de diâmetro em isolado CAM.B. ORF1-ORF1 bis= polimerase de RNA dependente de RNA; 1a= (MP) proteína de movimento 29K; 1b= proteína rica em cisteína, possível (VSR) supressor de silenciamento gênico; CP= capa proteica; 2b e 2c (P40 e P32, respectivamente), proteínas não estruturais relacionadas com a transmissão pelo vetor. Fonte: ViralZone: <a href="http://viralzone.expasy.org/">http://viralzone.expasy.org/</a> .....	28
Figura 5. Representação esquemática da introdução do sítio de clivagem AscI e PacI (via PCR) e do sítio múltiplo de clonagem de pBluescript por ligação de produto de PCR. O sítio de clonagem obtido a partir do pBluescript II SK+ (pBS) (amplificado pelos iniciadores T7 e T3) foi inserido entre AscI e PacI.....	38
Figura 6. Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> infectadas com o isolado CAM de PepRSV. Essas plantas foram inoculadas de forma mecânica (em suspensão de tampão fosfato) com o isolado de Campinas cedido pelo Prof. José Osmar Gaspar .....	39
Figura 7. Estratégias de clonagens utilizadas para recuperar o segmento genômico de PepRSV RNA1. A. Demonstração esquemática do PCR de fusão entre CaMV 35S e PepRSV RNA 1-5 e, posteriormente a clonagem em vetor comercial pGEMT-Easy-, estabelecendo a construção pGEM-T AscI-35S-PepRSV RNA1 1-5. B. Para RNA1 1-3 foi adicionada uma cauda de ribozima via PCR o qual foi clonado em pCR 4 TOPO, pcR4 PepRSV RNA1 1-3- PacI - HDV. ....	45
Figura 8. Estratégias de clonagens utilizadas para recuperar o segmento genômico de do RNA 2 de PepRSV. A. Demonstração esquemática do PCR de fusão entre CaMV 35S e PepRSV RNA 2 e adição da ribozima (HDV), posteriormente a clonagem em vetor comercial pCR4 TOPO, estabelecendo a construção pCR4 AscI-35S-PepRSV-PacI-HDV. B. mecanismo de transferência do cDNA entre o vetor comercial para o vetor binário.....	46

Figura 9. Representação esquemática da inserção de RNA2 em backbone do pTRV RNA2. Demonstração esquemática do PCR de fusão entre P35S-RNA2 (AscI-35S-PepRSV RNA2-PacI-HDV) em vetor binário (pCAMBIA) modificado para receber RNA2 de TRV..... 49

Figura 10. Representação esquemática dos clones em vetor binário com 35S e ribozima desse SCMoV. A- *Cassette* p35S-RNA1-sSCMoV; B- *Cassette* p35S-RNA2-sSCMoV..... 50

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose, 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação de toda a região genômica do isolado CAM de PepRSV. A: Amplificação de cDNA de RNA1 dividido em dois fragmentos. A1: PepRSV RNA1 1-3 (~3.600 pb), A2: PepRSV RNA1 1-5 (~4.200pb). B: cDNA do menor segmento genômico RNA2, (estimativa 1.700 pb). M=DNA ladder 1kb (Fermentas)..... 52

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose, 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio. Digestão AscI e PacI. pCR4 RNA1 1-3 digerido com AscI e PacI. M=DNA ladder 1kb (Fermentas)..... 55

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose, 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio. Amplificação de cDNA de PepRSV RNA2 e 35S. A1: Resultado da 2ª etapa da fusão usando enzima LongAmp. B1: Comparação entre o produto fusionado com o inserto em PCR. B1:,NF: fragmentos não fusionados B2: N=fusionados. M=DNA ladder 1kb (Fermentas)... 57

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose, 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio, dos clones selecionados para oRNA1 1-3 em fusão com 35S. A. pCR4 RNA1 1-3: dois plasmídeos purificados sem digestão e digerido com EcoRI. A1. PepRSV RNA1 1-3 clone 1 A2 digestão com EcoRI. M=DNA ladder 1kb plus (Invitrogen). ..... 58

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose, 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio, dos clones selecionados para o RNA1 1-3 e pGEM-T 35S-RNA1 1-5 com XbaI e PstI. 1. plasmídeo fechado; 2. pGME-T 35S- RNA11-5 digerido; 3. plasmídeo fechado e 4. cDNA RNA1 1-3. M=DNA ladder 1kb plus (Invitrogen). ..... 59

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose, 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio, dos clones selecionados para pGME-T - RNA1 PepRSV. A. clones selecionados a partir da clonagem de pGME-T 35S- RNA11-5 e cDNA RNA1 1-3. B. A partir da seleção do clone 1 da figura A procedeu-se uma digestão teste para linearizar a construção com PacI, na coluna 2 observa-se o resultado da digestão com AscI e PacI. M=DNA ladder 1kb (Fermentas). ..... 60

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose, 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio, de cDNA do PepRSV RNA2 por PCR de fusão e clonagem. A. Amplificação de *backbone* do pTRV e RNA2. Poço 1 e 2 Backbone do pTRV, poço 3 amplificação de RNA2. B. Fusão por PCR. Poço 1, DNA fusionada de backbone do pTRV e P35S-R2. N=fusionados, NF=

fragmentos não fusionados. C. Clones P35S-R2-RZsSCMoV. Poço 1 e 3, clone 1 e 2. Poço 2 e 4. Linearizado com AscI de clones.1 e 2. M=DNA ladder 1kb plus (Invitrogen).....	63
Figura 19. Representação esquemática do RNA2 dos isolados CAM, Pivo4 e Lavrinha. As sequências específicas de RNA2 estão representadas por barras e as posições de deleção pelo símbolo $\Delta$ . .....	72
Figura 20. Alinhamento múltiplo em aminoácido da capa proteica dos três isolados de PepRSV. ....	73
Figura 21. Árvore filogenética obtida a partir de aminoácidos presente na ORF da capa protéica dos isolados de PepRSV. ....	74

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1: Sequências de <i>primers</i> utilizados na modificação do vetor binário pCAMBIA .....	37
Tabela 2: Sequências de <i>primers</i> utilizados durante a construção do cDNA do isolado CAM de PepRSV.....	40
Tabela 3: Programa utilizado para overlap-extention PCR.....	44
Tabela 4: Sequências de <i>primers</i> utilizadas para atribuir um promotor e um terminador ao cDNA do isolado CAM de PepRSV. ....	47

## ABREVIACOES E SÍMBOLOS UTILIZADOS

Amp(R)	Resistência a ampicilina
CaMV 35S	Promotor de <i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	DNA complementar a um RNA mensageiro -
DNA	cido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotdeo
dot-ELISA	Dot Enzyme linked immunosorbent assay
Forward	Primer senso
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
HDV	simlesmente HDV  o acrnimo deste vírus. Sugestão: rrHDVV <i>Hepatitis Delta virus</i>
Km(R)	Resistência a kanamicina
Kpb	kilo-pares de base
LB	Luria-Bertani
nts	Nucleotídeos
$\mu$ g	Microgramas
ORF	Moldura aberta de leitura
pb	Pares de base
Rev	Antisenso
RNA	cido ribonucleico
RT-PCR	Transcrio reversa da reao em cadeia da polimerase
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
RZsSCMov	Ribozima de <i>Subterranean clover mottle virus satellite</i>
ssRNA	RNA fita simples
T7 RNAP	T7 RNA polimerase
<i>Taq</i>	DNA polimerase da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
UTR	Região não traduzida
UV	Ultravioleta
VIGS	Vírus que induz o silenciamento gênico
v/v	Volume/volume
p/v	Peso/volume

## RESUMO

*Pepper ringspot virus* (PepRSV) é um tobnavírus, até o momento, detectado somente no Brasil, que destaca-se dentro do gênero por apresentar curiosa associação entre as partículas virais e mitocôndrias do hospedeiro. Os poucos avanços descritos desde a década de 60 aos dias atuais não foram suficientes para demonstrar o mecanismo físico-químico que explica essa relação.

Na tentativa de ampliar o campo de estudo em PepRSV, buscou-se contruir um cDNA infeccioso visando o desenvolvimento de uma ferramenta capaz de expressar proteínas heterólogas ou induzir o silenciamento gênico: “*virus induced gene silencing*” (VIGS). Essa tecnologia visa a mesma aplicabilidade do cDNA infeccioso de *Tobacco rattle virus* (TRV), que já apresentou resultados significativos na indução de VIGS, contudo não pode ser utilizado livremente no Brasil, pois esse vírus é conhecido como praga quarentenária no País. Por essa razão, o uso de TRV em território brasileiro é restrito, principalmente pela dificuldade na obtenção de uma autorização de uso.

O PepRSV apresenta genoma bipartido de RNA fita simples. Durante a obtenção do clone desse vírus a ser utilizado como ferramenta molecular, os dois segmentos completos do RNA genômico foram clonados em vetores plasmidiais comerciais (pGEM-T Easy; pCR4) e modificados, em seguida, com a adição do promotor 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) na extremidade 5' e uma sequência de ribozima na região 3' do genoma de cada segmento. Além da construção dessa ferramenta, propõe-se avaliar a variabilidade do RNA2 de PepRSV, estudos que, atualmente, está restrito a um único isolado.

Dois isolados de PepRSV (Pivo4 e Lavrinha) obtidos em campos de tomateiro no município de Luziânia do Estado de Goiás foram utilizados nesse estudo. O RNA2, segmento genômico destes isolados foi sequenciado. A análise filogenética baseada na comparação de sequências de aminoácidos (aa) da capa proteica dos três isolados (Pivo4, Lavrinha e CAM) de PepRSV não separou Pivo4 e Lavrinha do isolado CAM, pois a inferência do algoritmo correspondente *bootstrap* foi irrelevante. Os isolados obtidos foram semelhantes ao isolado CAM e apresentaram ORF para capa proteica (CP), mas não apresentaram homólogos das ORFs 2a e 2b presentes em isolados da espécie tipo TRV que pertence ao mesmo gênero.

A comparação entre os três isolados sugere a presença de uma inserção a downstream a ORF do CP nos isolados Pivo4 e Lavrinha em relação ao isolado CAM e também uma recombinação na região 3' UTR entre as moléculas de RNA2 e RNA1 desses isolados.

## ABSTRACT

*Pepper ringspot virus* is a *Tobravirus* until now detected only in Brazil. It is a peculiar virus due to the occurrence of a curious association between viral particles and their host mitochondria. From the 60's to the present day, no studies have been able to demonstrate the physicochemical mechanism underlying this relationship.

In an attempt to broaden the studies on PepRSV, it was planned to construct an infectious cDNA clone to be used as a viral vector for expression of heterologous proteins or a virus induced gene silencing (VIGS) vector. It is proposed the construction of an infectious cDNA of PepRSV with a similar applicability of the *Tobacco rattle virus* (TRV) vector. It is already shown that this vector is useful in the induction of VIGS. The TRV vector cannot be used in Brazil, because it is a quarantine pest. Hence the use of TRV in Brazil is extremely limited, mainly due to the difficulty of obtaining a permission to use in the Brazilian territory.

The virus has a bipartite genome of single strand RNA components. During the construction development, the two complete segments of the genome of PepRSV were cloned in plasmid vectors (pGEM-T Easy; pCR4) and modified to contain a promoter 35 of *Cauliflower mosaic virus* in the 5' end and a ribozyme sequence in the 3' region of the genome of each segment.

Additionally to this construction for infectious clones, we propose to assess the variability of the PepRSV RNA2, which was restricted to a single isolate.

Two PepRSV isolates (Pivo4 and Lavrinha) obtained in tomato fields in the county of Luziânia, Goiás State. The genome segment (RNA 2) of these isolates was sequenced. Phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of coat protein (CP) among three isolates did not separate those isolates in different ramifications due to lower bootstrap value. The isolates obtained were in agreement as CAM isolate for coat protein (CP) ORF feature, but do not showed homologous ORFs2a and 2b present in TRV isolates of the *Tobravirus* type species.

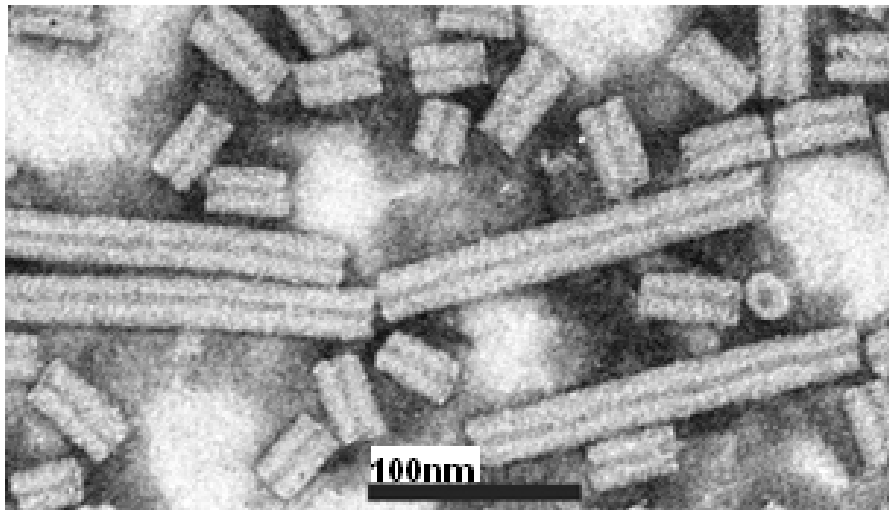
By sequence comparison, Pivo4 and Lavrinha isolates had presented large nucleotides insertion downstream of CP ORF as opposed to CAM isolate suggesting a recombination in 3'UTR between RNA1 and RNA2 of each isolate.



## INTRODUÇÃO

Popularmente conhecido como vírus da mancha anular do pimentão ou vírus da faixa amarela da alcachofra, *Pepper ringspot virus* (PepRSV), assim como o vírus do listrado necrótico do tabaco, *Tobacco rattle virus* (TRV) e o vírus do acastanhamento precoce da ervilha, *Pea early-browning virus* (PEBV) (Robinson, 2005; Almeida, 2005) são espécies presentes no gênero *Tobravirus*.

O isolado CAM (Campinas-SP), sinônimo do serotipo III de TRV (Robinson e Harrison, 1989), e, até o momento, o único representante de PepRSV (Robinson e Harrison, 1985). Esse isolado apresenta genoma constituído por RNA senso positivo bipartido em RNA1 e RNA2 de comprimentos predominantes de 197nm e 52 nm (Figura 1) respectivamente



**Figura 1. Apresentação das partículas virais de *Pepper ringspot virus* PepRSV.** Partículas negativamente contrastadas com fosfotungstato 2%. Barra representa 100 nm. Descrição de vírus de planta (DPV) <http://www.dpvweb.net>.

O PepRSV foi relatado pela primeira vez no Brasil na década de 60 (Kitajima *et al.*, 1969) infectando pimenteira e, até o momento, sua ocorrência parece estar restrita a este País (Robinson e Harrison, 1989). Este vírus apresenta uma ampla distribuição entre diferentes hospedeiros, embora não apresente nenhum estudo sistemático (MacFarlane, 2010). Os sintomas induzidos por PepRSV podem ser identificados pela presença de manchas

amareladas na forma de anéis na folha e no fruto, além do desenvolvimento de folhas enrugadas (Figura 2) (Robinson e Harrison, 1989).



**Figura 2. Sintomas de mancha anular e enrugamento em folhas de tomateiro.** Isolado Lavrinha detectado no município de Luziânia - GO.

A nível molecular, o RNA2 de PepRSV apresenta uma característica incomum ao gênero *Tobravirus*. A presença de dois conjuntos diferentes de repetição direta imperfeita em *tandem* de 2x119 nucleotídeos (nts) e 2x76nts na sequência na região 5'UTR (antes do códon de iniciação: AA'BB') para única fase aberta de leitura (ORF) presente, que corresponde à capa proteica viral (Bergh *et al.*, 1985).

A *downstream* dessa ORF observa-se a ausência dos genes 2b e 2c em relação à constituição genômica de TRV, espécie tipo do gênero *Tobravirus*. O RNA1, muito conservado dentro do gênero, contém as ORF's para a replicação do RNA e para infecção sistêmica nas plantas.

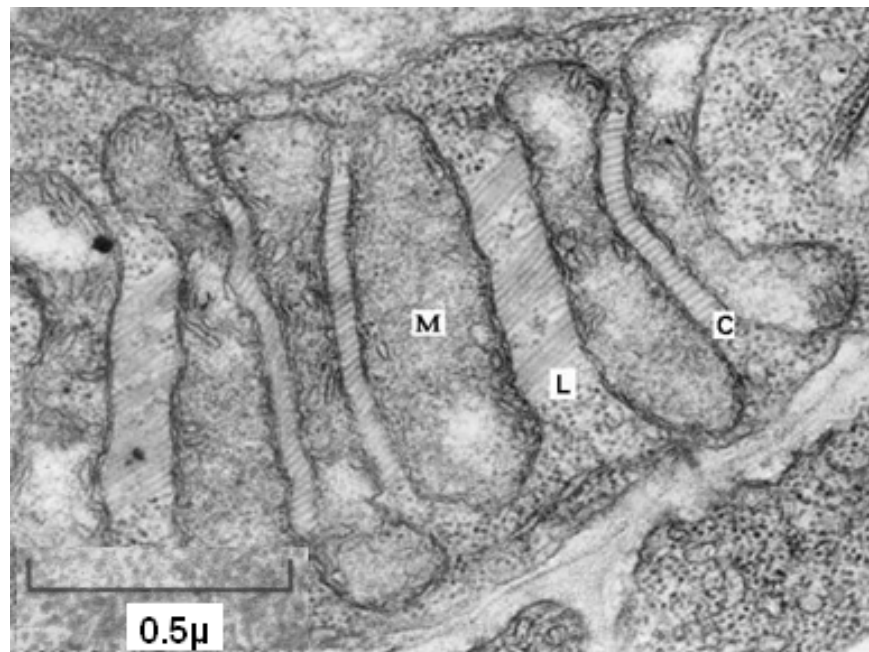
De acordo com MacFarlane (1996) o gene 2b é essencial para manter a transmissibilidade das espécies de tobravirus por nematoides tricodórideos, que são vetores naturais pertencentes à família *Trichodoridae* (Almeida, 2005). No entanto, a ausência dos genes 2b e 2c, em PepRSV, aparentemente, não inviabiliza a transmissão dessa espécie pelo vetor biológico natural, *Paratrichodorus minor* (= *Trichodorus christiei*) (Almeida, 2005).

A partir do exame em microscópio eletrônico, observou-se que o isolado CAM de PepRSV apresenta uma associação entre suas partículas virais (de formato alongado e rígido) e as mitocôndrias das células hospedeiras (Figura 3) (Kitajima e Costa, 1969). Embora se

desconheça as relações físico-químicas desta relação, sabe-se, que as partículas virais ficam bem ordenadas na superfície da membrana externa das mitocôndrias e, que essa agregação não é uniforme entre as partículas do RNA1 e RNA2. Às vezes, observa-se apenas a partícula longa (RNA1) em associação com as mitocôndrias (Kitajima e Costa, 1969). Em outros momentos, visualizou-se ambas partículas (RNA1 e RNA2) associadas as mitocôndrias de forma uniforme (Gasparet *al.*, 1984).

Essa característica não pode ser diagnosticada como um dado exclusivo de PepRSV, mas um dado capaz de diferenciá-lo das demais espécies dentro do gênero *Tobravirus*. Na literatura há relatos de vírus como: *Henbane mosaic vírus* (HMV) (gênero *Potyvirus*) (Kitajima e Lovisolo, 1972) e *Broad bean wilt vírus* (BBWV) (gênero *Fabavirus*) (Hull e Plaskitti, 1974), que apresentam associação entre partículas virais e mitocôndrias do hospedeiro, embora não tão frequente como observado em PepRSV.

Trabalhos posteriores realizados por Russo e Martelli (1981) com *Cymbidium ringspot vírus* (CymRSV) (gênero *Tombusvirus*) e Esau (1979) com *Beet yellow stunt vírus* (BYSV) (gênero *Closterovirus*) apresentaram uma associação mais estreita entre as cristas das mitocôndrias e as partículas virais.



**Figura 3. Micrografia de partículas do nome por extensoPepRSV associadas às mitocôndrias.** M=mitocôndria, L= partícula longa, C= partícula curta. Fonte:Kitajima e Costa, 1969).

A relação entre partículas virais e mitocôndrias dos hospedeiros pode ser uma estratégia estabelecida pelo vírus, como mecanismo de sobrevivência, já que esses são patógenos obrigatórios intracelulares e, necessitam de células vivas para replicação.

A hipótese capaz de justificar esse evento proporcionará a análise entre a perda de potencial de membrana e a geração de moléculas reativas de oxigênio (ROS). O ROS altera o fluxo de íons, proteínas e desfosforilação a partir de um distúrbio entre as atividades metabólicas de cloroplastos e mitocôndrias (Liu *et al.*, 2007). Assim, é provável que os vírus que se associam às mitocôndrias tentem inviabilizar a liberação da proteína sinal, impedindo a formação da cascata de proteínas kinases capazes de ativar o processo mitogenico (MAPKs).

O mecanismo de defesa das plantas, frequentemente inclui a morte celular programada (MCP, ou PCD– “programmed cell death”), também conhecida como resposta de hipersensibilidade (Ordog *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Rikhvanovet *al.*, 2007) definida por uma cascata de eventos que conduzem a uma destruição controlada e organizada da célula. Estudos recentes demonstram que o envolvimento de uma proteína quinase específica, ativada por um circuito de cascata hexoquinases “mitogen-activated protein kinases” [cascata de MAPKs, que consiste em três etapas MAPKs, SIPK, NTF4 e WIPK Kim *et al.* (2006), Liu *et al.* (2007), Gao *et al.* (2008) e Zhang e Xing (2008), ativam eventos como a perda do potencial de membrana, vazamento de eletrólitos e rápida desidratação o que caracteriza a apoptose celular (Liu *et al.*, 2007). Esse mecanismo de morte da célula é marcado pela diminuição da atividade celular, condensação de fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos (Adrainet *al.*, 2001).

De acordo com essa necessidade de conhecimento das atribuições de PepRSV com as plantas hospedeiras, propõe-se o desenvolvimento de uma ferramenta molecular capaz de manter o genoma do isolado CAM de PepRSV em associação a sequências nucleotídicas que apresentam atribuições de infecção via *Agrobacterium tumefaciens*. Assim, sugere-se que PepRSV e seu hospedeiro, *Capsicum* spp. ou *Nicotiana* spp. podem ser utilizados como modelo capaz de fornecer dados sobre a relação entre o PepRSV e o seu hospedeiro. Essa ferramenta em associação com microscopia confocal a laser fornecerá dados que possibilitarão a elucidação dos diversos fenômenos biológicos desenvolvidos durante o processo de infecção.

Vale ressaltar porém, que este tipo de trabalho é inédito no mundo, considerando-se que o PepRSV apresenta envolvimento com as mitocôndrias no processo de infecção, interação com pouca relevância na literatura, além de ser uma espécie restrita ao Brasil. Temos ainda com esse clone, a oportunidade de elucidar o aspecto molecular de dois novos

isolados, a fim de avaliar a variabilidade presente no RNA2 genômico e elucidar o aspecto evolutivo de PepRSV em detrimento da recombinação gênica entre as regiões 3'UTR do RNA1 e RNA2 da mesma espécie.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1. Família *Virgaviridae*

De acordo com Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), a família *Virgaviridae* foi nomeada porque os seus representantes apresentam partículas virais envolvidas por uma capa protéica atribuindo um formato de bastonete com diâmetro entre 20-25nm e, inclui os gêneros *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* e *Tobravirus*.

Essa família foi mantida como um grupo filogenético por apresentar genes como a proteína de replicação com conformação alfa-hélice, que suportam a criação da família; genoma de RNA fita simples senso positivo com uma estrutura de t-RNA em detrimento de uma cauda poliA, que mantém a distinção de outras categorias virais e, por fim uma proteína de movimento com peso entre 19-24kDa, que a atribui como particularidade (Adams *et al.*, 2009).

Os gêneros *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus* utilizam os *plasmodioforídeos* no campo como vetores naturais, enquanto o gênero *Tobravirus* mantém o seu ciclo de infecção a partir da ingestão por nematoides do conteúdo das células superficiais da epiderme das raízes das plantas, as quais são perfuradas pelo onquioestilete (Almeida, 2005). Já os membros do *Tobamovirus* não apresentam vetor de transmissão aparente (Adams *et al.*, 2009).

Quanto às particularidades, os furovírus com genoma bipartido, apresenta capa proteica em associação com o domínio RdRp, enquanto os pecluvírus, também de genoma bipartido, apresenta os três genes em bloco para a proteína de movimento. Os hordeivírus apresentam genoma tripartido, com destaque para a RNA polimerase das outras proteínas de replicação no RNA2, enquanto ospomovírus, apresentam um bloco com três genes para proteína de movimento e a capa proteica tem domínio RdRp associado com a transmissão vetorial.

O único representante monopartido entre os tobamovírus, assemelha-se àquele do gênero *Tobravirus* por apresentar uma proteína de movimento com 30kDa; mas difere pela organização genômica e pelo fato dos tobavírus manterem uma relação com vetores biológicos (Adams *et al.*, 2009).

## 2. O gênero *Tobravirus*

A organização genômica dos *Tobravirus* apresenta o RNA1 como fonte genômica capaz de codificar todas as proteínas necessárias para manter a infecção viral. Dessa organização, duas proteínas são responsáveis pela replicação viral, uma de movimentado vírus célula-célula dentro da planta hospedeira e, uma terceira ORF tem função de supressor de silenciamento gênico pós-transcricional PTGS (MacFarlane 2006). O segmento menor, RNA2, codifica a capa proteica (22-24kDa), o que favorece a formação do virion. Em alguns isolados, a *downstream* dessa ORF, proteínas não estruturais são codificadas e requeridas para transmissão por nematoides no campo (MacFarlane, 1996).

Essa organização mostra uma característica interessante dos tobrovírus, a capacidade de manter dois tipos de infecção: a infecção tipo M, também conhecida como infecção múltipla entre o RNA1 e o RNA2 e a infecção NM ou infecção não múltipla, em que relatos destacam apenas a ação do RNA1 no organismo vegetal (Sanger, 1969).

A infecção M ou múltipla apresenta ambos os segmentos genômicos (RNA1 e RNA2) envolvidos por uma nucleoproteína e, também é possível detectar uma associação dessas partículas com os nematoides presentes no campo, reconhecidos com vetores naturais (MacFarlane, *et al.*, 1991).

A ausência do RNA2 em isolados do tipo NM inviabiliza a formação de partículas e na transmissão no campo por vetores biológicos, mas não interfere na capacidade de replicação e, nem na infecção sistêmica do vírus que pode ser adquirido por propagação vegetativa, sementes contaminadas (Costa e Kitajima, 1968) ou por via reprodutiva, grão de pólen (Camargo *et al.*, 1969).

Quanto aos sintomas, o PEBV causa infecções sistêmicas em várias espécies de leguminosas (Constantinet *et al.*, 2004), enquanto, PepRSV, vírus característico de pimenteira e eventualmente encontrado em alcachofra promove o aparecimento de manchas cloróticas na forma de anel (Harrison e Robinson, 1986).

O TRV, espécie tipo do gênero *Tobravirus* tem a capacidade de infectar grande diversidade de culturas incluindo aquelas que produzem tubérculos e, bulbos ornamentais, além de plantas ornamentais como ervas daninha (Liu *et al.*; 2002). Esse vírus induz sintomas sistêmicos ou locais, como a descrição de necroses e cloroses de formas diversas além das distorções nas folhas (Souza-Dias, 2001).

Em culturas de valor comercial como a batata, o TRV é capaz de induzir sintomas de necrose nas formas de arcos ou círculos arroxeados tanto superfície do tubérculo quanto no

tecido interno, também associado a traços necróticos do tipo arco ou círculos de coloração marrom nas folhas (Souza-Dias, 2001).

Estudos realizados por Dale e colaboradores em 2004 demonstraram que alguns cultivares de batata, quando infectados por estirpes tipo-M podem manifestar infecção sistêmica, o qual persiste ao longo de gerações por propagação vegetativa, apesar de exibirem pouco ou nenhum sintoma típico de TRV no tubérculo. O efeito dessa infecção pode resultar no retardamento do crescimento da planta e, subsequentemente, na redução da produção de tubérculos.

Acerca das relações estabelecidas entre as espécies de tobravírus, o TRV apresenta partículas e propriedades genômicas similares às demais espécies do grupo, mas se distinguem quanto aos sintomas induzidos nos hospedeiros e à capacidade de produzir isolados NM (Robinson e Harrison 1989).

O isolado CAM entre outros previamente identificados na América do Sul foi inicialmente classificado como sorotipo III de TRV, em detrimento às características fenotípicas presentes nas plantas hospedeiras durante a infecção. No entanto, dados da sequência de nucleotídeos e o estudo de hibridização o mantiveram fora do grupo de TRV pela falta de homologia, via hibridização com cDNA do RNA1 do isolado CAM, que agora passa a constituir uma espécie tipo de *Pepper ringspot virus* (Robinson e Harrison, 1985).

O TRV também pode distinguir-se de *Pea early-browning virus* (PEBV) pela incapacidade de infectar sistematicamente *Pisum sativum* e *Phaseolus vulgaris*, pela presença de pontos de descoloração, anéis necróticos e descoloração pontual que podem ocorrer tanto na folha quanto no caule, pela produção de pequenos pontos de lesão em feijão e, por testes de hibridização apresentando incompatibilidade com sondas do RNA1 (Robinson *et al.*, 1987; Liuet *al.*, 2002).

Em relação à distribuição de tobravírus, o TRV em particular apresenta ampla distribuição incluindo áreas temperadas e tropicais com exceção do Brasil. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sobre vigência da Instrução Normativa 41 (2008), esse vírus é considerado uma praga quarentenária ausente, o que significa que não ocorre no País.

O PEBV, encontrado principalmente no Norte da Europa e Norte da África, também apresenta restrições em território brasileiro, mas não é considerada praga quarentenária. Enquanto, PepRSV, descrito apenas no Brasil, tem acesso restrito a isolado, o acesso CAM de Campinas-São Paulo.



### 3. Transmissão e o ciclo de infecção do *Tobravirus*

No campo, os tobravírus são transmitidos de planta a planta por nematoides dos gêneros *Paratrichodorus* ou *Trichodorus* (Família *Trichdoridae*), que habitam o solo e, atuam como vetores naturais (MacFarlane e Popovich 2000). A transmissão do vírus pelo vetor envolve a ingestão das partículas virais a partir de plantas infectadas por tobravírus (Ayala e Allen, 1968). Nos tricodorídeos, as partículas virais aderem à parede do esôfago, ao longo de toda a sua extensão, onde podem permanecer até que os nematoides se alimentem novamente (Almeida, 2005).

Os tricodorídeos são ectoparasitas migratórios, o que significa que se alimentam sem local fixo. A alimentação processa-se a partir do conteúdo das células superficiais da epiderme das raízes das plantas, as quais são perfuradas pelo onquioestilete (Almeida, 2005). As células mais profundas não são atingidas, devido ao onquioestilete ser relativamente curto (Almeida, 2005).

Como não há relatos de replicação de tobravírus em organismo animal, a atividade de virulência fica restrita à ingestão do vírus por células epiteliais presentes nas raízes de plantas infectas e, a eliminação dele por um mecanismo de secreção pela cavidade bucal do nematoide, dentro do meristema da planta (Bannon, 1990). Essas condições, porém, podem promover necrose e nanismo no órgão associado (Bannon, 1990).

Há evidência de especificidade entre isolados de tobravírus e espécies de vetores da família *Trichdoridae* (Van Hoof, 1968). Essa especificidade pode variar desde a organização genômica até as condições do solo (Van Hoof, 1968). No entanto, essa exclusividade ainda requer conhecimentos sobre a associação do vetor com as partículas virais.

Os tobravírus, além de serem transmitidos pelos tricodorídeos também apresentam vias de transmissão alternativas como semente, enxertia, grão de pólen e/ou inoculação mecânica (Almeida 2005).

A transmissão de tobravírus pela semente ocorre em pequena percentagem nas sementes novas, que aparentemente não apresentam sintomas, como PEBV, que pode até apresentar uma taxa de 25% de infecção em sementes de ervilhas sem apresentar sintomas aparentes (Bos e Van der Want, 1962).

Isolados CAM de PepRSV causaram contaminação entre 15-30% em sementes de tomateiro infectado (Costa e Kitajima, 1968). Entretanto, esta via de transmissão, ainda apresenta baixa frequência, mas apresenta-se com papel importante na disseminação do vírus para novos locais (Harrison e Robinson, 1978).

#### 4. Organização genômica de *TOBRAVIRUS*

A sequência do RNA1 de TRV tem até 99% de identidade entre as ORFs conservadas dos poucos isolados de tobrovírus conhecidos da mesma espécie (MacFarlane, 1999; Sudarshana e Berger, 1998). Já a 5'UTR (sequência nucleotídica da região 5' não expressa) do RNA1 apresenta pouca similaridade, mas possui uma característica interessante, pois contém repetições diretas e imperfeitas de 22 nucleotídeos e que também está presente na região de RNA2 (Hamilton *et al.*, 1987). Entre ambos os segmentos genômicos, RNA1 e RNA2, também se observa uma identidade de até 73% na região 3'UTR (sequência nucleotídica da região 3' não expressa) (Robison e Harrison, 1985).

A região 3' UTR do RNA2 e do RNA1 de TRV são recombinantes naturais. Cerca de 1.000 pb da região 3' UTR de RNA2 do TRV é completa ou altamente idêntica às regiões dos genes 1a e 1b do segmento genômico RNA1 (MacFarlane, 1999). Entretanto, no isolado CAM do PepRSV, 459nts da 3'UTR do RNA1 e do RNA2 são idênticos (Bergh *et al.*, 1985). No entanto, essa semelhança nucleotídica não interfere na expressão das proteínas de cada compartimento genômico, apenas realça a possibilidade de recombinação (MacFarlane, 1999).

Além dessas características de similaridade, o RNA2 assim como RNA1, apresentam 140nts no final da região 3', que facilmente dobra-se formando uma estrutura terciária composta por uma dupla hélice que termina em uma região de *loop*, além de um domínio parecido com a de um braço de anticódon (pseudoknot) (van Belkum *et al.*, 1987). Na extremidade 5' UTR observa-se uma estrutura "Cap 5' " que é gerada pela ligação 5'-5' trifosfato entre a extremidade 5' de uma molécula de mRNA precursora e um nucleotídeo alterado (GMP metilado) (Alberts *et al.*, 2008). O cap 5' auxilia na proteção do genoma viral contra a ação de ribonucleases e também é responsável por interagir e direcioná-lo à síntese em ribossomos dentro da maquinaria celular (Goulden *et al.*, 1990).

Atipicamente aos RNAs virais, o RNA2 genômico dos tobrovírus não atua diretamente na síntese de nenhum produto, apesar de possuir a ORF da capa proteica (figura 4), pois a região 5'UTR possui cerca de sete códons de iniciação seguidos por códons de parada, assim a síntese dessa proteína é estabelecida a partir de RNA subgenômico (sgRNA) (Robinson, 1983).

De acordo com a Figura 4, o RNA1 apresenta três ORFs, uma próxima à região 5'UTR que codifica uma proteína, de peso molecular 134 kDa e, que contém aminoácidos associados com a metiltransferase e a helicase (MacFarlane, 1999). Uma segunda ORF

imediatamente a *downstream*, ORF1bis que, é capaz de complementar as informações contidas na ORF1, e, assim, codificar uma terceira proteína com aminoácidos dependentes de polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) (MacFarlane, 1999).

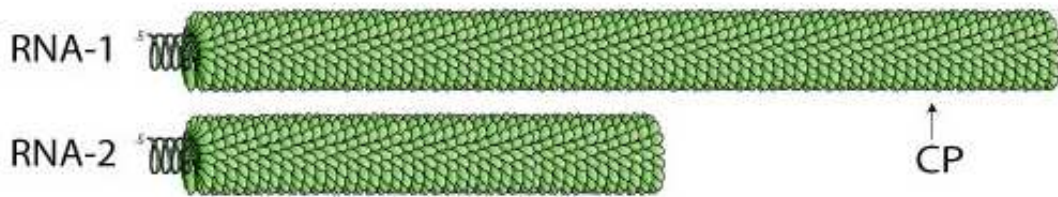
Localizada a *downstream* do gene polimerase, a ORF1a, responsável por codificar uma proteína de 29 kDa, está relacionada com a movimentação do vírus dentro do hospedeiro (MacFarlane, 1999). Enquanto o gene próximo à região 3'UTR codifica uma proteína com C-terminal rica em cisteína que codifica um supressor de silenciamento (Martín-Hernández e Baulcombe, 2008) em outros casos está associado com a transmissão do vírus por sementes (Edwards, 1995).

Ao contrário do RNA1, o estudo de hibridização com RNA2 mostrou pouca identidade entre os isolados de tobrovírus (Robinson e Harrison, 1985). Essa variabilidade considerável entre os diferentes isolados dificulta a descrição do tipo selvagem ou da organização genômica completa da espécie tipo de tobrovírus. (Harrison e Robinson, 1986; MacFarlane, 1999).

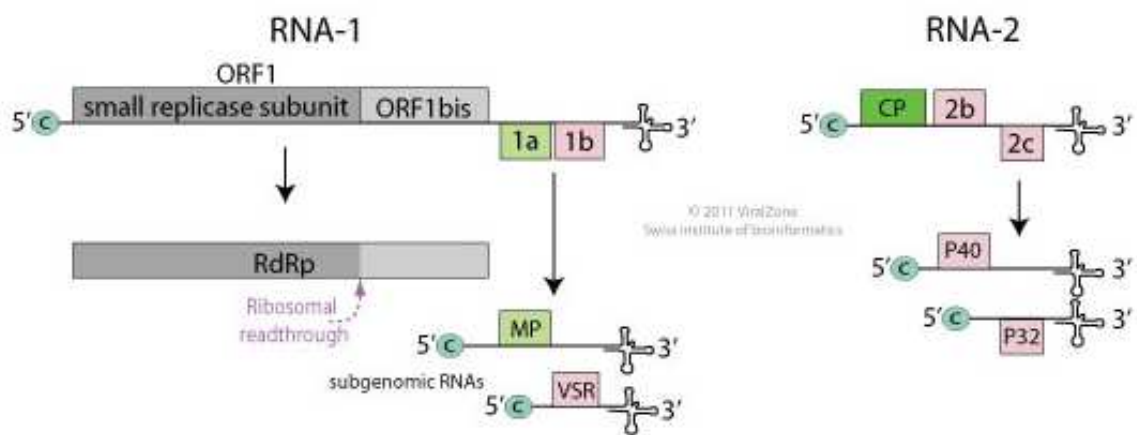
No entanto, o RNA2 mantém uma ORF conservada entre os isolados de tobrovírus que é responsável por codificar o gene da capa proteína (Figura 4). Além dessa ORF, alguns isolados também apresentam duas ORFs não estruturais *downstream* que estão associadas ao processo de transmissão do vírus pelo nematoides (Ploeg et al., 1993). Contudo, os isolados que perderam os genes de transmissão podem surgir na estufa por inoculação mecânica ou no campo por propagação vegetativa (MacFarlane, 1999).

A proteína 2b (Figura 4) a partir de estudos com clones infecciosos tem-se mostrado absolutamente necessária na transmissão do vírus através dos nematoides (MacFarlane et al., 1996). Já a proteína 2c, que ainda não apresenta uma função específica, destaca-se, a partir de estudos de deleção ou mutação da ORF no clone infeccioso, como agente importante na redução significativa durante a transmissão de PEBV por *Trichodorus primitivus* (MacFarlane, 1999).

## A VIRION



## B GENOME



**Figura 4. Organização genômica de um tobavírus (TRV).** A. Representação esquemática da composição dos segmentos de 180-215 e 46-115nm de comprimento por 22nm de diâmetro em isolado CAM.B. ORF1-ORF1 bis= polimerase de RNA dependente de RNA; 1a= (MP) proteína de movimento 29K; 1b= proteína rica em cisteína, possível (VSR) supressor de silenciamento gênico; CP= capa proteica; 2b e 2c (P40 e P32, respectivamente), proteínas não estruturais relacionadas com a transmissão pelo vetor. Fonte: ViralZone: <http://viralzone.expasy.org/>

## 5. Áreas de pesquisa em *Tobravirus*

A investigação de *Tobravirus* como agente patogênico foi motivada como causa de doença emergente na cultura da batata. O TRV, um patógeno importante em culturas que produzem tubérculo, induz sintomas que podem emergir durante toda a colheita e pode causar inviabilização da comercialização de produtos. Essas informações justificam a necessidade de um diagnóstico pré-estabelecido antes da produção, associado ao desenvolvimento de técnicas culturais e mecanismos capazes de inviabilizar a disseminação viral pela colheita.

Esse vírus também pode ser estudado como organismo de direito, e não causa de doença emergente, tendo em sua organização genômica a chave do conhecimento para promover hipóteses de infecção e ferramenta molecular capaz de expressar genes heterólogos, não virais em plantas hospedeiras. Esses esforços foram concentrados, especialmente em TRV, com a construção de vetores VIGS (Liu *et al.*, 2002; Ratcliff *et al.*, 2001), que resultaram na indução de silenciamento gênico em plantas infectadas, a partir de genes homólogos inseridos no RNA2 do vírus, o que promoveu a degradação total ou parcial do mRNA deste gene.

PepRSV não foi alvo de estudo na literatura desde o sequenciamento completo da capa proteica (Bergh e Siegel, 1989) e da modificação do RNA2 como vetor de expressão de proteínas recombinantes (MacFarlane e Popovich, 2000). Aspectos moleculares de transmissão por sementes em PEBV têm sido previamente descritos (MacFarlane, 2003). Os trabalhos mais recentes sobre PEBV concentraram-se na sua utilização como vetor de silenciamento gênico (VIGS) (Constantin *et al.*, 2008).

## 6. *Tobravirus* como vetores de expressão ou indutores de silenciamento gênico

Vetores de expressão criados com base em RNA2 de TRV, PEBV e PepRSV (MacFarlane e Popovich, 2000) com a combinação de RNA1 do TRV são utilizados para expressar proteínas em folhas e em raízes. A maior aplicabilidade dessa ferramenta molecular em *tobravirus*, especialmente TRV, é como vetor de silenciamento gênico (MacFarlane, 2010).

O silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) tem se destacado como importante ferramenta, permitindo a descoberta e validação de funções gênicas de plantas (Eamens *et al.*, 2008). Esses estudos são realizados por meio da inoculação de plantas jovens com vetores virais que carregam um fragmento do gene alvo, visando o desencadeamento do *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) e análise do fenótipo resultante (Unver e Budak, 2009).

Durante o mecanismo de VIGS uma molécula de RNA fita dupla (dsRNA) é processado pela enzima “Dicer” em RNAs pequenos interferentes (siRNAs) de aproximadamente 21-24 nucleotídeos. Estes siRNAs resultantes da clivagem pela Dicer associam-se então a proteínas que discriminam qual das duas fitas serão incorporada ao complexo de silenciamento RISC (RNA induced silencing complex) (Tomari *et al.*, 2004). O complexo RISC analisa o mRNA existente na célula, direcionando a clivagem sequência-específica de mRNAs complementares do siRNA (Hutvagner e Zamore, 2002). conseqüentemente, ha geração de modificações celulares epigenéticas, que podem ser herdadas para as células filhas através da mitose, sem que haja alteração na sequência de nucleotídeos do DNA (Alberts *et al.*, 2008).

O vetor de TRV infecta principalmente *Nicotiana benthamiana* (Ryu *et al.*, 2004; Senthil-Kumaret *al.*, 2007), mas também tomate (*Solanum lycopersicum*; Liu *et al.*, 2002), batata (*Solanum tuberosum*; Brigneti *et al.*, 2004), pimenta (*Capsicum annum*; Chung *et al.*, 2004), *Arabidopsis thaliana* (Burch-Smith *et al.*, 2006), petúnia (*Petunia x hybrida*, Spitzer *et al.*, 2007). Uma extensão a essa técnica foi estabelecida pela indução de silenciamento gênico via TRV em nematóides (Dubreuil *et al.*, 2009). O vetor PEBV também surge com a intenção de ampliar ainda mais, a gama de plantas alteradas por VIGS, principalmente, no campo das leguminosas, como ervilha (Bleinet *al.*, 2008), *Medicago truncatula* e *Lathyrus odorata* (Gronlund *et al.*, 2008). PEBV também foi usado para estudar o desenvolvimento de nódulos radiculares simbióticos em ervilha, proporcionando um sistema muito mais maleável do que o mecanismo experimental disponível (Constantin *et al.*, 2008).

O motivo ou o porquê espécies de Tobravirus são eficazes como vetores VIGS, ainda não foi relatado, embora TRV, particularmente, seja bem sucedido, em parte, pela presença de gama de hospedeiros, por indução de silenciamento forte, constante e uniforme ao longo dos tecidos vegetais (MacFarlane, 2010). A eficiência de um VIGS é fortemente influenciada pelas espécies de plantas que são utilizadas, como exemplo, *N. benthamiana*, sensível ao silenciamento induzido por vírus, provavelmente por um defeito do gene RDR1 em *N. benthamiana* (Yang *et al.*, 2004).

A infecção pelo TRV ocorre a produção de siRNAs específicos dos vírus (Donaire *et al.*, 2008). A partir destas informações é provável que a capacidade de VIGS induzida por TRV resulte em equilíbrio entre o grau de eficiência da supressão e o sistema de silenciamento gênico do hospedeiro, o que permite propagação satisfatória de infecção, mas grau insuficiente de supressão que acomete a estabilidade do sistema vegetal. Em apoio a esta

hipótese, foi demonstrado que a proteína de 16kDa do TRV(ORF1b) é fraca e atua transitoriamente como supressor de PTGS (Martín-Hernández e Baulcombe, 2008).

Plantas transgênicas de *N. Benthamiana* e *N. Tabacum* que expressam a proteína supressora de PTGS, 126kDa (ORF1) do *Tobacco mosaic virus* foram inoculadas com TRV carregando fragmento do gene de phytoene desaturase (PDS) (Harries *et al.*, 2008). Nessas plantas, foi observado que houve aumento da infecção por TRV e do efeito de VIGS. Isso sugere que há relação entre a atividade silenciamento e a resposta VIGS, apoiando a hipótese de que a eficiência de VIGS depende do equilíbrio entre a quantidade de vírus e o mecanismo de defesa do hospedeiro.

## JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de um clone de cDNA infeccioso de PepRSV em vetor binário contendo o promotor 35S de CaMV e a ribozima de sSCMoV permitirá a agroinoculação em plantas e a recuperação do vírus completo. O cDNA infeccioso de PepRSV poderá ser útil para o estudo da interação vírus-hospedeiro, como vetor de expressão heteróloga de proteínas (proteína recombinante) e como vetor de VIGS. O grande atrativo deste projeto é que o vetor será desenvolvido com um vírus relatado somente no Brasil e não haverá restrições oriundas de “Acordos de Transferência de Materiais”.

Estudos com tobrovírus foram desenvolvidos em isolados de TRV. Com a realização desse estudo com os novos isolados de PepRSV, Pivo 4 e Lavrinha, será possível expandir os conhecimentos no vírus e verificar se o PepRSV compartilha das mesmas propriedades moleculares que TRV. A análise da sequência do RNA2 dos novos isolados de PepRSV poderá mostrar a existência ou não da variabilidade do RNA2, como observado em isolados de TRV. Finalmente, o estudo genômico do RNA2 demonstrará a presença ou não dos genes homólogos a 2a e 2b, relacionados à transmissão do TRV por nematoides.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Construir uma ferramenta molecular a partir do cDNA do isolado CAM de PepRSV, contendo o genoma inteiro de PepRSV (RNA1 e RNA2, em separado) em vetor binário flanqueando pelo promotor de CaMV 35S na extremidade de 5' e a ribozima de sSCMoV na extremidade 3'. Avaliar e comparar sequência nucleotídica do RNA2 de dois isolados de PepRSV (Pivo 4 e Lavrinha) obtidos de tomateiro, no campo para a realização de estudo de variabilidade genômica.

### **Objetivos específicos:**

#### **Capítulo II**

- Obtenção de clone do RNA 1 de PepRSV em vetor binário e confirmação via sequenciamento.
- Obtenção de clone do RNA 2 de PepRSV em vetor binário e confirmação via sequenciamento.

#### **Capítulo III**

- Extrair RNA total a partir de folhas de plantas infectadas com os dois novos isolados (Pivo 4 e Lavrinha) de tomateiro de PepRSV.
- Obter o cDNA de RNA2 desses vírus via RT-PCR.
- Clonar e sequenciar o RNA2 dos novos isolados de PepRSV
- Comparar o grau de identidade das sequências nucleotídicas e de aminoácidos e dos isolados Pivo 4 e Lavrinha com o isolado CAM depositados em banco de dados.

## CAPÍTULO II

### DESENVOLVIMENTO DO cDNA DO ISOLADO CAM DE PepRSV COM ATRIBUIÇÕES INFECTIVAS VIA *AGROBACTERIUM*

**Resumo.** *Pepper ringspot virus* (PepRSV), anteriormente conhecido como sorotipo III de *Tobacco rattle virus* (TRV) apresenta uma interação não compreendida entre suas partículas virais e as mitocôndrias do hospedeiro. Na busca de uma ferramenta capaz de elucidar a relação entre as partículas virais de PepRSV e seu hospedeiro propõe-se a construção do cDNA de PepRSV em vetor binário contendo o promotor de CaMV 35S e uma sequência de ribozima de *Hepatitis Delta virus* (HDV) ou *Subterranean clover mottle virus satellite* (sSCMoV), sem nenhum nucleotídeo de origem não viral na extremidade 5' e 3'.

## 1. Introdução

A tecnologia aplicada à expressão de proteínas heterólogas em plantas é estabelecida pela expressão transiente mediada por um vírus pela maquinaria vegetal. Para esse sistema o vírus contendo o gene de interesse irá replicar e, a proteína exógena contida no seu material genético sobre orientação de um promotor forte será expressa em quantidades relativamente favoráveis. A utilização de vetores virais tem várias vantagens, dentre elas a rapidez com que as proteínas heterólogas podem ser produzidas, o alto rendimento e o fato de que, como o gene não é incorporado ao genoma da planta, não se tem uma característica hereditária e, assim essa informação genética é contida em uma única geração, com exceção de vírus capazes de infectar sementes (Sharma e Sharma, 2009).

A expressão transiente é rápida e o desenvolvimento de proteínas exógenas expressas pode ser avaliado com eficiência em poucos dias. A utilização de clones infecciosos em estudos de genética reversa possui várias vantagens quando comparada a outras técnicas de análise funcional em plantas, como o *knocking-out* ou interrupção gênica (Unver e Budak, 2009).

Para o desenvolvimento de um vetor viral utiliza-se o cDNA genômico completo do vírus em associação a um promotor e um terminador, a *downstream* e a *upstream*, respectivamente, que possam permanecer ativos em células hospedeiras eucarióticas (Sharma e Sharma, 2009). Essa construção, então, pode ser inoculada diretamente no sistema vegetal via agroinfiltração, biobalística ou inoculação mecânica.

As desvantagens advindas dessa técnica se constituem em uma frequência de erros de replicação, eventos de recombinação que podem causar instabilidade e deleção de genes exógenos, tanto em vírus de DNA quanto de RNA, principalmente em sistemas onde grandes segmentos exógenos são inseridos (Giddings *et al.*, 2000).

As espécies classificadas no gênero *Tobravirus*, *Pepper ringspot virus* (PepRSV), *Tobacco rattle virus* (TRV) e *Pea early-browning virus* (PEBV) (Robinson, 2005) podem ser bem sucedidos como vetores de expressão de genes heterólogos ou indutores de silenciamento gênico graças a sua disposição genômica, que possibilita a manipulação gênica do RNA2 sem intervenção na capacidade de infecção em plantas hospedeiras (MacFarlane, 2010). Para esse gênero, o RNA1 codifica todas as funções necessárias para replicação e movimento do vírus em planta e o RNA2, com tamanho menor, e de constituição variável, codifica a capa proteica do vírus, além de outras proteínas não estruturais.

Estudos relatam a aplicabilidade de TRV e PEBV como vetores de VIGS para direcionar os estudos de genes vegetais ou interação de planta-patógeno, no entanto, o TRV, que não ocorre no Brasil é considerado uma praga quarentenária (categoria A1) pelo MAPA, tem o seu campo de pesquisa limitado. No entanto, PepRSV, foi relatado pela primeira vez no Brasil na década de 60 (Kitajima *et al.*, 1969) e, até o momento, sua ocorrência parece estar restrita ao Brasil apresentando características adequadas ao desenvolvimento de um vetor viral. Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um cDNA do isolado CAM de PepRSV com atribuições necessárias para infecção em plantas pelo sistema de agroinfiltração.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Modificação do vetor binário pCAMBIA

Inicialmente, modificou-se o vetor binário, pCAMBIA (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), via PCR utilizando os *primers* antisenso aaaAscI-LB 6640 e senso cccPacI-NOS 43 (Tabela 1), com a intenção de inserir sítios de clivagem para as enzimas de restrição AscI e PacI (Figura 5). Esses primers foram desenhados a partir da sequencia consenso dos acessos de pCAMBIA disponiveis no GenBank.

Posteriormente, substituiu-se o sítio múltiplo de clonagem do pCAMBIA em detrimento ao sítio do plasmídeo pBluescript II (pBS) (Figura 5), visando ampliar a região de restrição.

### 2.2. Isolado viral e plantas utilizadas

O isolado CAM de PepRSV (isolado de Campinas, cedido por Prof. José Osmar Gaspar, UNESP, São José do Rio Preto/SP) foi mantido e propagado por meio de inoculação mecânica em *Nicotiana benthamiana*. O extrato foliar, usando como fonte de inóculo, foi preparado a partir de folhas de *N.benthamiana* infectadas, armazenadas em freezer a -80°C, e maceradas em tampão fosfato 0,01M pH7.0, contendo sulfito de sódio e em seguida inoculadas mecanicamente. As plantas utilizadas foram mantidas em casa de vegetação (figura 6).

**Tabela 1: Sequências de *primers* utilizados na modificação do vetor binário pCAMBIA**

\*sublinhado = sítios de enzimas de restrição.

Identificação do <i>primer</i>	Sequência dos <i>primers</i>
aaaAscI-LB 6640 rev	*5'- tttggcgcgccaattgtttaccacaat-3'
cccPacI-NOS 43 for	*5'-ccct <u>taatta</u> acgaatttccccgatcgttcaaac-3'



**Figura 5. Representação esquemática da introdução dos sítios de clivagem AscI e PacI (via PCR) e do sítio múltiplo de clonagem de pBluescript por ligação de produto de PCR. O sítio de clonagem obtido a partir do pBluescript II SK+ (pBS) (amplificado pelos iniciadores T7 e T3) foi inserido entre AscI e PacI.**



**Figura 6. Plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas com o isolado CAM de PepRSV.** Essas plantas foram inoculadas de forma mecânica (em suspensão de tampão fosfato) com o isolado de Campinas cedido pelo Prof. José Osmar Gaspar

### 2.3. Síntese de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar a sequência do cDNA do isolado CAM (Tabela 2) foram desenhados a partir de sequências RNA1 (NC\_003669) e RNA2 (NC\_003670) depositadas no banco de dados DDBJ/EMBL/GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)). *Primers* foram desenhados adicionando ancorase regiões (que tipo de regiões) para serem sobrepostas para realização do “Fusion PCR”.

**Tabela 2: Sequências de *primers* utilizados durante a construção do cDNA do isolado CAM de PepRSV.**

\* letras maiúsculas = à sequência parcial originária de p35S e minúsculas de origem viral

Identificação do <i>primer</i>	Sequência dos <i>primers</i>
35S + PepRSV RNA-1 5'Cloning For (P1)	5'-AGTTCATTTTCATTTGGAGAGGaaaacaattagaatattt gaa-3' *
PepRSV-3'Cloning +HDV5'Half Rev (P2)	5'GCCAGCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCgggcgt gataacgttcacgg -3' *
35S + PepRSV RNA-2 5'Cloning For(P3)	5'-AGTTCATTTTCATTTGGAGAGGaaaatttcagaatgtctt cg-3' *
PepRSV-R1-5' Rev-2 (Pi1)	5'-ctccacgaatttcccggaaa-3'
PepRSV-R1-3' For-2(Pi2)	5'-ggtatatgaaacagtgaaaga-3'
PepRSV-R1-3' For-3 (Pi3)	5'-gtatgtcaaaggagatcagaa-3'



## 2.4. Extração do RNA total isolado do CAM de PepRSV

Amostras foliares, apresentando sintomas como anéis necróticos foram coletadas de plantas de *N. benthamiana*, aproximadamente 14 dias pós-inoculação (Figura 6). O RNA total foi extraído, utilizando a solução “Plant RNA reagent” (Invitrogen), conforme as orientações do fabricante.

## 2.5. Síntese do cDNA viral e amplificação

O oligonucleotídeo antisense PepRSV-3' Cloning +HDV5' Half Rev (P2) (Tabela 1) (5'GCCAGCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCgggcgtgataacgttcacgg -3'), desenhado a partir da sequência comum da extremidade 3' de RNA1 e RNA2, foi utilizado na síntese do cDNA do isolado CAM de PepRSV. Para a reação de transcrição reversa, 5µl de RNA total extraído foi usado com 1µl de dNTPs 10mM, 1µl de *primer* PepRSV-3'Cloning +HDV5'Half Rev (P2) (10mM) (Tabela 1) e 5µl de água Milli-Q autoclavada. A reação foi aquecida a 75°C por 5 minutos e resfriada no gelo por mais 5 minutos; em seguida, adicionou-se à reação 4µl de tampão 5X FS, 2 µl de DTT (0,1M), 1µl de RNase OUT e 1µl da enzima transcriptase reversa Superscript III (200U|µl) (invitrogen). A extensão de cDNA foi feita a temperatura de 48°C por 60 minutos. A enzima foi inativada com o tratamento da solução em 75°C por 15 minutos. Na tentativa de fragmentar o RNA, adicionou-se 1µl de RNase H (Invitrogen) a solução acima, e a mesma foi submetida a condição de 37°C por 30 minutos.

Um segundo oligonucleotídeo, iniciador senso 35S + PepRSV RNA-2 5'Cloning For(P3) (5'GCCAGCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCgggcgtgataacgttcacgg -3') no qual se anela na extremidade 5' do RNA2 de CAM, foi sintetizado para utilização na reação na cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR). Para amplificar a região RNA1 do isolado CAM, o *primer* senso 35S + PepRSV RNA-1 5'Cloning For (P1) (5'-AGTTCATTTCAATTTGGA GAGGaaacaattagaatatttgaa-3') (Figura 7) foi utilizado com mesmo *primer* antisense PepRSV-3'Cloning +HDV5'Half Rev.

Para recuperação do segmento genômico total do RNA1 realizamos a fragmentação do cDNA do PepRSV em RNA1 1-5, em que é mantido com utilização do *primer* P1 como senso e o *primer* PepRSV-R1-5' Rev-2 (Pi1), como antisense, (Tabela 2). Para amplificações internas foi utilizado o *primer* PepRSV RNA1 1-3 e o PepRSV-R1-3' For-2(Pi2) com iniciadores senso os inibidores senso e P2 (Tabela 2), antissenso. (Figura 7).

## 2.6. Análise das sequências do cDNA do isolado CAM

As sequências de nucleotídeos do cDNA do isolado CAM foram compiladas no programa Staden Package (Staden *et al.*, 2003). As sequências foram alinhadas com sequências de CAM pelo método Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) e depositadas em banco dados DDBJ/EMBL/GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)).

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos gerados pelo método de Clustal W forneceram dados necessários para o desenvolvimento do cDNA via *Agrobacterium* spp.

## 2.7. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

As reações de PCR descritas nesse trabalho foram feitas utilizando os seguintes reagentes (New England Biolabs - NEB) e concentrações para um volume final de 50 µl: 5µl do cDNA, 10 µl de dNTP (2,5 mM), 5 µl de tampão 5X “Reaction buffer” (60 mM Tris-SO<sub>4</sub> em pH 9,0; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,0 mM MgSO<sub>4</sub>); 2,0µl de *LongAmp* DNA Polymerase (NEB) para minimizar o erro de incorporação de nucleotídeos durante a amplificação dos fragmentos, 2 µl de cada iniciador (senso e o antisenso, 10mM) e 24 µl de água Milli-Q autoclavada. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf) com as seguintes condições 80° C por 1 minuto (1 ciclo), 94° C por 2 minutos (1 ciclo), passando a seguir para 35 ciclos, sendo cada um composto de desnaturação das fitas a 94°C por 15 segundos, anelamento dos iniciadores a 56°C por 1 minuto e, no ultimo ciclo, extensão a 65°C por 4 minutos. Concluídos os 35 ciclos a temperatura permanece a de 65°C por 10 minutos (1 ciclo).

## 2.8. Modificação do cDNA de CAM a partir da inserção do promotor 35S CaMV e da ribozima

Os produtos de cDNA de RNA1 e RNA2 do isolado CAM de PepRSV por PCR, foram submetidos à adição de adenosina na extremidade 3' (*A-overhanging*), por intermédio de 0,2 unidade de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) sobre condição de 72° C por 30 minutos, para facilitar a clonagem desses fragmentos em vetor comercial TA “pGEM-T Easy” (Promega) ou “pCR TOPO cloning Kit for sequencing” (Invitrogen). Em seguida, o DNA foi purificado, a partir de gel de agarose a 0,8 % (p/v) corado com violeta cristal (40µg/mL), utilizando o kit “PureLink Gel extraction” (Invitrogen) de acordo com as orientações do

fabricante. Ao término desse procedimento, o cDNA já purificado foi clonado em vetor TA utilizando “pCR TOPO cloning Kit for sequencing” (Invitrogen) e pGEM-T Easy (Promega), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, procedeu-se à transformação em células competentes de *Escherichia coli*, cepa DH5 $\alpha$ .

Após a confirmação da identidade e da integridade do cDNA de PepRSV RNA1 1-5 (extremidade 5' de RNA1), do PepRSV RNA1 1-3 (extremidade 3' de RNA1) e do clone PepRSV RNA2; esses foram modificados com a adição de um promotor e de uma cauda de ribozima (HDV).

Para a adição do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), atribuiu-se um sítio para AscI via PCR, a partir dos *primers*: AscI-35SP-For (V14) e P35S-3' Rev (P16) (Tabela 3), desenhados para conter uma sobreposição entre a região de extremidade 5' de RNA1 e RNA2. Após a PCR, o produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). O DNA correspondente ao fragmento de 170 pb (Figura 7A) foi purificado e eluído do gel corado com violeta cristal, utilizando o “PureLink Gel extraction kit” (Invitrogen) conforme as orientações do fabricante.

Para o cDNA de PepRSV RNA1 1-5, utilizou-se o iniciador senso 35S + PepRSV RNA-1 5'Cloning For (P1) e o antisenso PepRSV-R1-5' Rev-2 (Pi1) e, mantendo-se o mesmo procedimento de amplificação e recuperação para o promotor.

Em seguida, esses fragmentos foram fusionados via “overlap-extention PCR”(Tabela 4) sobre orientação da Figura 7A. O produto de fusão, *cassette*AscI-p35S-PepRSV RNA1-5, foi ligado ao vetor comercial pGEM-T Easy (Promega) e transformado em *E.coli*. cepa DH5 $\alpha$  (Figura 7A).

Para a segunda subclonagem do RNA1, PepRSV RNA1 1-3 modificado a partir da adição de uma cauda de ribozima via PCR, com o *primer* HDV-PacI Rev (HDV) (Tabela 2) foi clonado em “pCR TOPO cloning Kit for sequencing”(Figura 7B) e mantido em *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ .

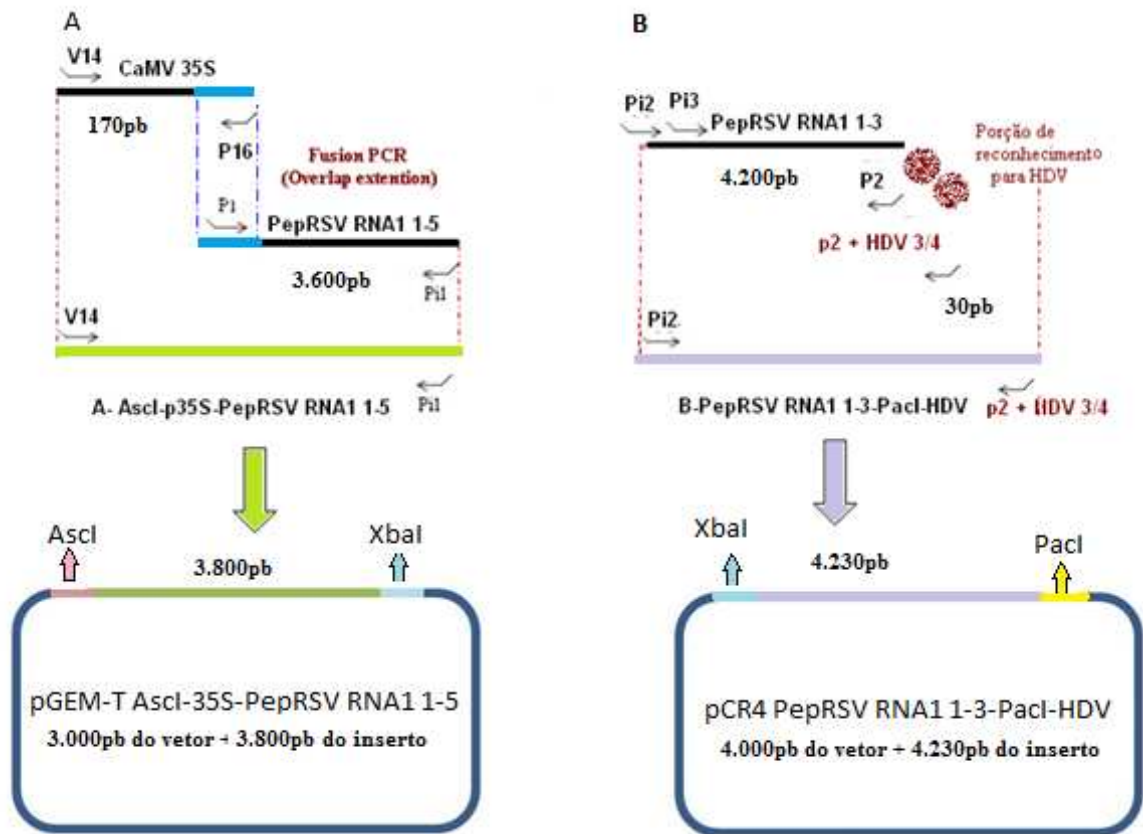
Os clones pGEM-T AscI-35S-PepRSV RNA1 1-5 obtidos após a inserção do promotor 35S CaMV e o clone PepRSV RNA1 1-3- PacI - HDV ribozima foram previamente selecionados pelo tamanho estimada em gel de agarose a 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio, a partir da digestão com EcoRI. Esses foram digeridos com PstI, sítio de restrição presente no vetor e XbaI presente na organização genômica de PepRSV. O fragmento liberado a partir do clone PepRSV RNA1 1-3- PacI - HDV foi clonado em pGEM-T AscI-35S-PepRSV RNA1 1-5 resultando no cDNA inteiro de RNA1 modificado de CAM em vetor comercial.

Para modificação do cDNA RNA 2 do isolado CAM de PepRSV, a estratégia utilizada foi semelhante à adotada para modificação do cDNA do RNA1. O cDNA PepRSV RNA2 foi amplificado via PCR utilizando *primer* antisenso HDV-PacI Rev (HDV) (Tabela 3) em associação ao iniciador senso P3 (Tabela 2) (Figura 8). Em seguida, p35S CaMV foi amplificado como os iniciadores AscI-35SP-For (V14) e P35S-3' Rev (P16) (Tabela 3). Ambos foram fusionados via “overlap-extention PCR” (Tabela 4), como descrito para RNA1-5, organizando assim uma quimera determinada pelo *cassette* p35S-RNA2-HDV PacI (Figura 8). Após a fusão, o fragmento obtido foi clonado em “pCR TOPO cloning Kit for sequencing” (Figura 8A) e transformado em DH5 $\alpha$  cepa de *E. coli*.

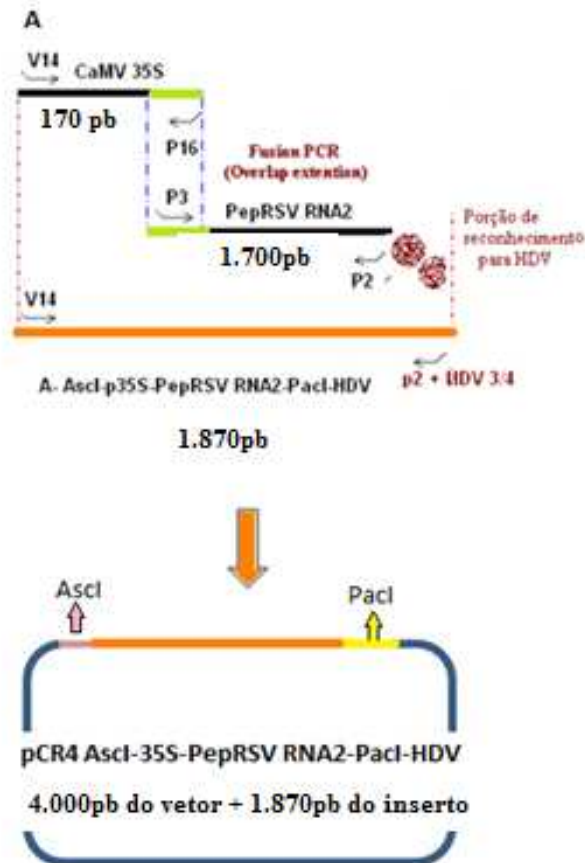
**Tabela 3: Sequências de *primers* utilizados para atribuir um promotor e um terminador ao cDNA do isolado CAM de PepRSV.**

\*sublinhado = sítios de enzimas de restrição.

Identificação do <i>primer</i>	Sequência dos <i>primers</i>
AscI-35SP-For (V14)	*5'-tatttaaggcgcgccacgacacacttgctactcc-3'
P35S-3' Rev (P16)	5'-cctctccaaatgaaatgaacttctt-3'
HDV-PacI Rev (HDV)	*5'- <u>attaattaagatcccattcg</u> cattgccagccggcgccagcg aggaggctgggacatgccggcc -3'



**Figura 7. Estratégias de clonagens utilizadas para recuperar o segmento genômico de PepRSV RNA1.** A. Demonstração esquemática do PCR de fusão entre CaMV 35S e PepRSV RNA 1-5 e, posteriormente a clonagem em vetor comercial pGEMT-Easy-, estabelecendo a construção pGEM-T Ascl-35S-PepRSV RNA1 1-5. B. Para RNA1 1-3 foi adicionada uma cauda de ribozima via PCR o qual foi clonado em pCR 4 TOPO, pCR4 PepRSV RNA1 1-3-PacI - HDV.



**Figura 8. Estratégias de clonagens utilizadas para recuperar o segmento genômico de do RNA 2 de PepRSV. A.** Demonstração esquemática do PCR de fusão entre CaMV 35S e PepRSV RNA 2 e adição da ribozima (HDV), posteriormente a clonagem em vetor comercial pCR4 TOPO, estabelecendo a construção pCR4 AscI-35S-PepRSV-PacI-HDV. **B.** mecanismo de transferência do cDNA entre o vetor comercial para o vetor binário.

**Tabela 4: Programa utilizado para overlap-extention PCR**

Programa 1	Programa 2 - OVERLAP
94°C - 5 minutos	95°C - 2 minutos
30 ciclos	35 ciclos
94°C - 1minuto	94°C - 30 segundos
55°C - 1minuto	56°C - 1 minuto
65°C - 1minuto	65°C - 4 minutos
Término dos ciclos	Término dos ciclos
65°C - 10 minutos	65°C - 10 minutos

### **2.9. Adequações nucleotídicas em cDNA CAM modificado pela inserção de um promotor e uma ribozima para atribuir capacidade de infecção via *Agrobacterium* em plantas hospedeiras**

Na tentativa de recuperar o cDNA presente na construção P35S-RNA2-HDV foi realizada digestão com enzima PmeI e, após selecionar o fragmento de maior tamanho, removeu-se utilizando a enzima *fill-in* com *Mung bean nuclease*, o nucleotídeo adenosina, o que permitiu a formação de uma sequência abrupta. Esses fragmentos foram digeridos com AscI e purificados a partir de gel de agarose e eluídos com “PureLink Gel extraction kit”(Invitrogen). O mesmo procedimento foi mantido para o vetor de expressão pCAMAP, cortando com PacI primeiro, digerindo extremidade destacada com *Mung bean nuclease* para *fill-in* e digerindo, em seguida com AscI. Esses produtos foram então, ligados com T4 DNA ligase. Após a , a nova construção foi transformada em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Os clones selecionados foram submetidos a um processo de digestão com AscI para confirmar a presença do inserto em vetor binário. Confirmado em gel de agarose e, por sequenciamento, o clone pCAMAP-RNA2-PepRSV (clone 28).

A partir de uma mutação nucleotídica identificada no sítio da ribozima (HDV) gerada nos clone cDNA RNA1 e cDNA RNA2, buscou-se em um vetor binário já modificado e testado para TRV uma alternativa que inclui a substituição da ribozima. O TRV que é uma praga quarentenária no Brasil, apresenta dificuldades de utilização e manutenção em território nacional. Em virtude dessas informações foi utilizado o segundo segmento genômico do vírus

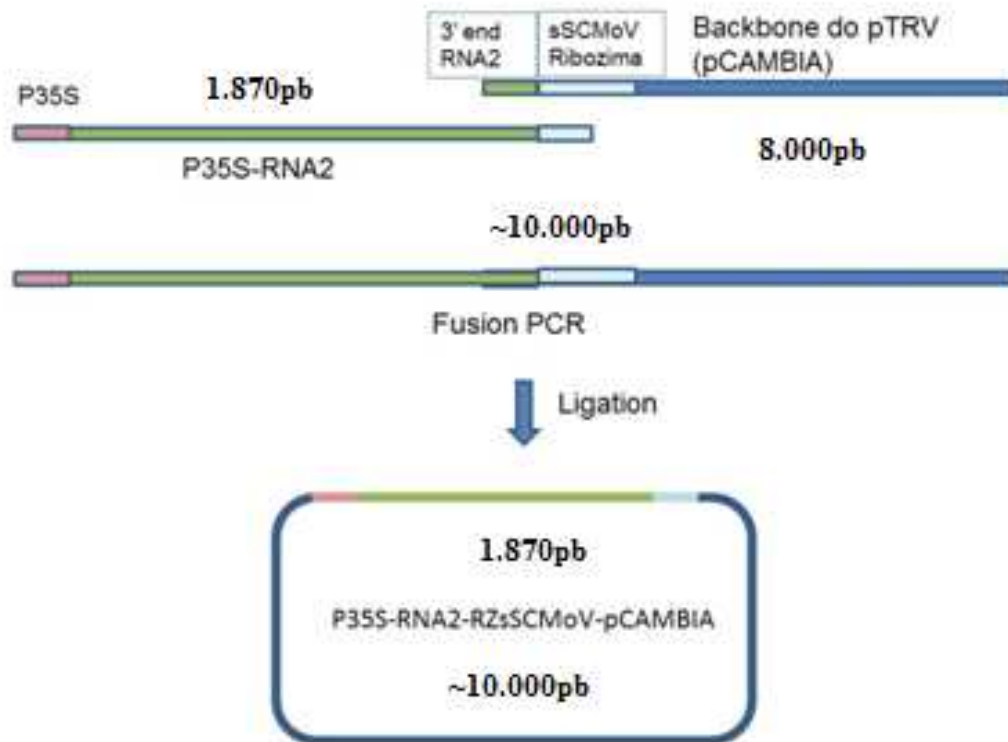
TRV, o RNA2, que comprovado cientificamente não apresenta riscos de disseminação, pois esse segmento não contém genes capazes de promover a infecção sistêmica, mas ORFs para capa proteica e outras funções não estruturais.

O *backbone* do pTRV2-MSV contendo p35S duplicado, ribozima do sSCMoV, terminador NOS, *left border* e *right border* foi amplificado por PCR utilizando *proof-reader* Phusion DNA polymerase (New England Biolabs) com *primer* senso PepRSV Ribo pCAM For (5'-CCG TGA ACG TTA TCA CGC CCG TCT GTA CTT ATA TCA GTA CAC TGA C-3') e o antisenso pCAMBIA-0380 (5'-AAC ATG GTG GCC TAG GAA TT-3'). O segmento de RNA2 de PepRSV também foi amplificado utilizando *primers* senso AscI-35SP-For2 (5'-AAG GCG CGC CAC GAC ACA CTT G TC TAC T-3') e o antisenso PepRSV Ribo RNA2 Rev (5'-GTC AGT GTA CTG ATA TAA GTA CAG ACG GGC GTG ATA ACG TTC ACG G-3'). Ambos produtos da PCR foram fusionados utilizando “Overlap-extension PCR” (Figura 9) e ligados às extremidades com a reação de fosforização com *polynucleotide kinase* (NEB) e, em seguida, à *T4 DNA ligase* (NEB). Esta ligação foi transformada em *E. coli* cepa DH10B, mais apropriada para recepção de grandes construções. Assim, o clone de RNA2 foi inserido com a sequência do ribozima de sSCMoV.

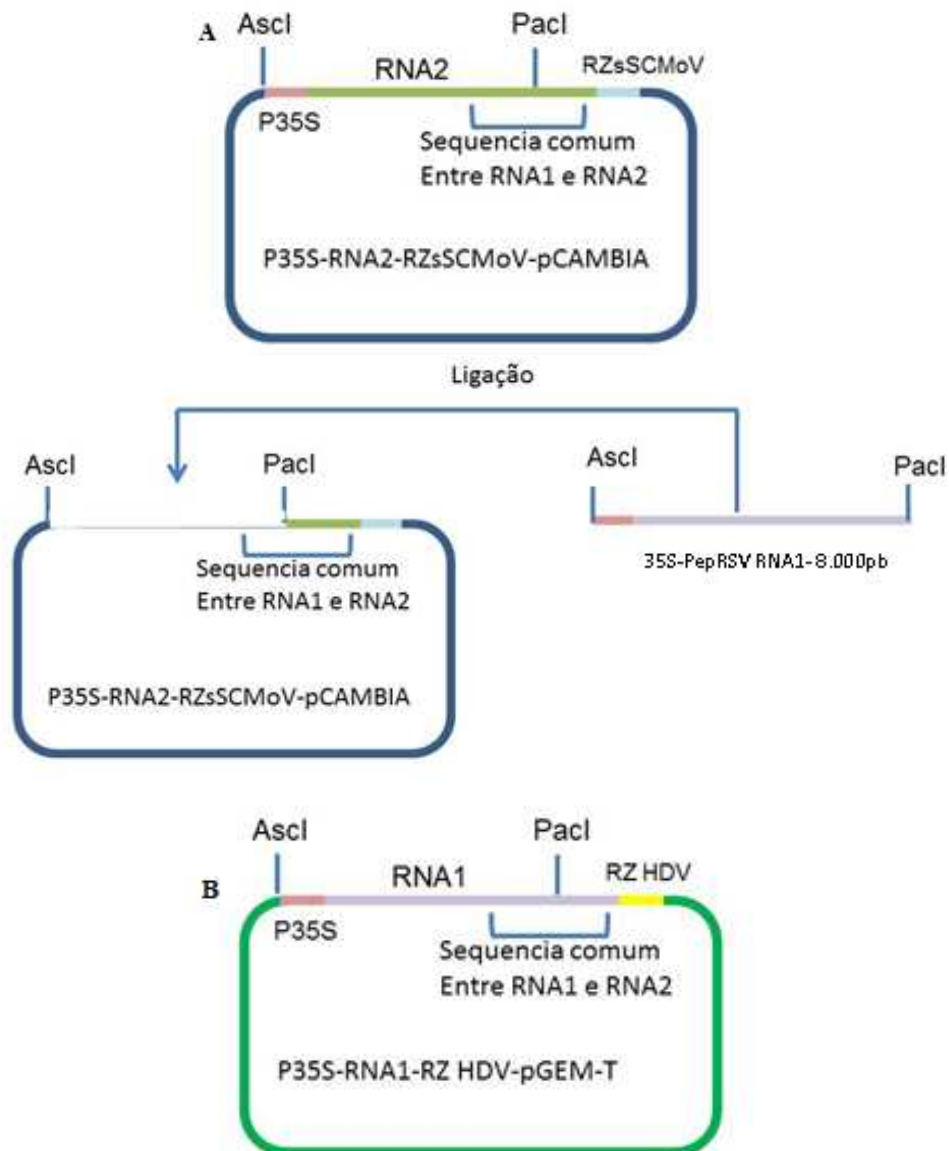
Com a confirmação desse clone, p35S-RNA2-RZsSCMoV-pCAMBIA, buscou-se a associação entre o RNA1 presente em pGEM-35S-RNA1-PacI-HDV e o *backbone* do pTRV2-MSV modificado pela presença do RNA2, inicialmente presente em pCR4-TOPO-35S-RNA2-PacI-HDV, com a finalidade de manter o mesmo sítio de ribozima, sSCMoV.

Assim, iniciou-se essa nova etapa com digestão dupla dos sítios AscI e PacI, tanto para pGEM-35S-RNA1-PacI-HDV quanto para o vetor p35S-RNA2-RZsSCMoV-pCAMBIA seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, o DNA correspondente ao fragmento do RNA1 (Figura 10A) foram purificados e eluídos do gel de agarose 0,8% (p/v) corado com violeta cristal, utilizando o “PureLink Gel extraction kit” (Invitrogen) conforme orientações do fabricante. Posteriormente, clonados e transformados em *E. coli* cepa DH10B.





**Figura 9. Representação esquemática da inserção do RNA2 em backbone do pTRV RNA2.** Demonstração esquemática da PCR de fusão entre P35S-RNA2 (AscI-35S-PepRSV RNA2-PacI-HDV) em vetor binário (pCAMBIA) modificado para receber RNA2de TRV.



**Figura 10.** Representação esquemática dos clones em vetor binário com 35S do CaMV e ribozima do SCMoV. A- *Cassette* p35S-RNA1-sSCMoV; B- *Cassette* p35S-RNA2-sSCMoV.

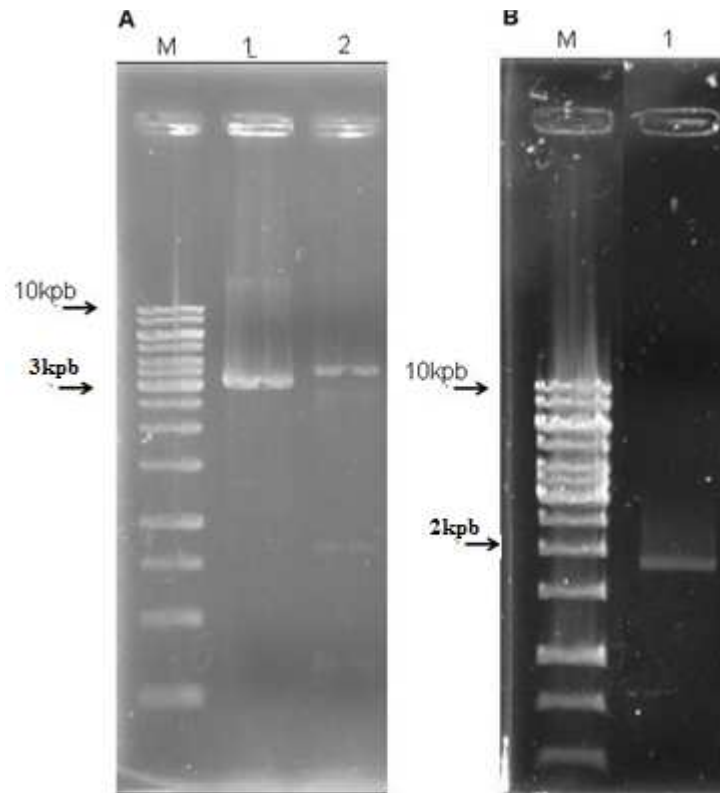
### 3. Resultados

#### 3.1. Desenvolvimento de Oligonucleotídios internos para o RNA1

Considerando a dificuldade em recuperar o RNA1 (6.828 pb) inteiro por meio da PCR, propõe-se o desenho de novos *primers* internos, entretanto, mantendo sobreposição de porções dos fragmentos amplificados que contém um sítio de enzima de restrição XbaI no meio. Foram PepRSV-R1-5' Rev-2 (Pi1), PepRSV-R1-3' For-2 (Pi2) e PepRSV-R1-3' For-3 (Pi3) (Tabela 1).

#### 3.2. Amplificação e clonagem do cDNA genômico do isolado CAM de *PepRSV*

A amplificação por PCR dos fragmentos genômicos do isolado CAM de *PepRSV* resultou na obtenção de fragmentos de RNA2 completos a partir da combinação dos *primers* P2 e P3 (Tabela 1) (Figura 11B), no entanto, a amplificação do cDNA do RNA1, utilizando a combinação de *primers* P2 e P1 (Tabela 1) não foi satisfatória pela impossibilidade de amplificação de forma íntegra do segmento de uma só vez. Na tentativa de superar esta dificuldade, optou-se por separar o segmento do RNA1 (6879 nt) em duas regiões, sendo assim designada como região 5' do RNA1, compreendendo aproximadamente 4.200 pb (clone *PepRSV* RNA1 1-5), e região 3' do RNA1, com 3.600 pb (clone *PepRSV* RNA1 1-3) (Figura 11A).



**Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação do fragmento do genoma do isolado CAM de PepRSV. A:** Amplificação de cDNA do RNA1 dividido em dois fragmentos. A1: PepRSV RNA1 1-3 (~3.600 pb), A2: PepRSV RNA1 1-5 (~4.200 pb). **B:** cDNA do menor segmento genômico, RNA2, (estimativa 1.700 pb). M=DNA ladder 1kb (Fermentas).

### 3.3. Análise das sequências do cDNA do isolado CAM de *PepRSV*

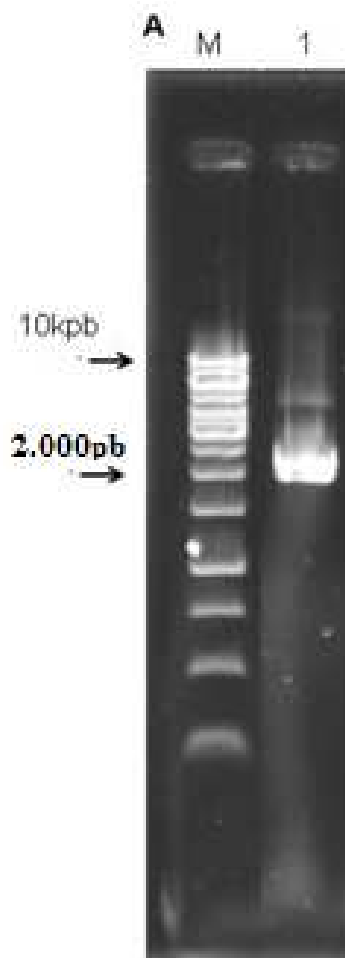
Os clones obtidos em vetor comercial pGEM-T e pCR4-TOPO foram selecionados a partir de digestão com EcoRI, sítio presente em ambos os vetores que flanqueiam a região do inserto. Os clones foram selecionados pela posição estimada em eletroforese de gel de agarose, sendo conferidos por meio do sequenciamento dos fragmentos realizado pela empresa Macrogen (Coréia do Sul). Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa *Staden Package* (Staden *et al.*, 2003) para confirmar a integridade das sequências. Após a confirmação, essas foram identificadas a partir da análise do algoritmo Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) (Altschul, *et.al.*, 1990) em comparação com as sequências já depositadas nesse banco de dados.

As sequências nucleotídicas do RNA1 e do RNA2, descritas nesse trabalho, apresentaram 99,8% de identidade com as sequências do isolado CAM de *PepRSV* depositadas por Berch e colaboradores entre 1985 e 1993 em banco de dados.

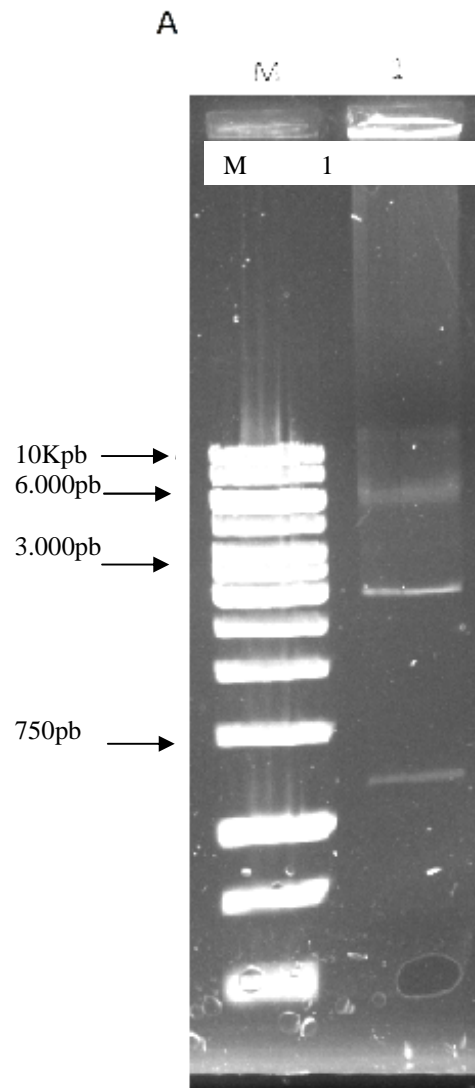
### 3.4. Modificação cDNA RNA2 via PCR

Para construção do cDNA via *Agrobacterium*, após a confirmação, por sequenciamento, da identidade do segmento de cDNA genômico do RNA2 do *PepRSV* clonado em pCR4-TOPO, iniciou-se a modificação do fragmento com adição do promotor 35S de CaMV, por intermédio *Overlap-extension* PCR (PCR de fusão) (Figura 12). Também, procedeu-se à inserção do sítio de clivagem AscI na extremidade de 5' do promotor, para subclonar em vetor binário modificado de pCAMAP.

Para avaliar a viabilidade da utilização desse clone modificado (pGEM-T AscI-35S-*PepRSV* RNA1-PacI-HDV), foram realizados testes iniciais como liberação do inserto a partir da digestão com AscI e PacI, segundo as recomendações do fabricante. No entanto, o resultado obtido não descreve o esperado (Figura 13). A liberação de três fragmentos demonstra a presença de dois sítios de restrição PacI, sendo um presente no genoma viral e outro na constituição do *primer* utilizado durante a adição da cauda de HDV. Assim, a estratégia de clonagem teve que ser modificada.



**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose (0,8 %) corado com brometo de etídio, mostrando o RNA2 em fusão com 35S. Resultado do processo de fusão entre o 35S e PepRSV RNA2 a partir da representação esquemática 5A. M=DNA ladder 1kb (Fermentas).



**Figura 13. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio. Digestão AscI e PacI. Plasmídeo pCR4 RNA1 1-3 digerido com AscI e PacI. M=DNA ladder 1kb (Fermentas).**

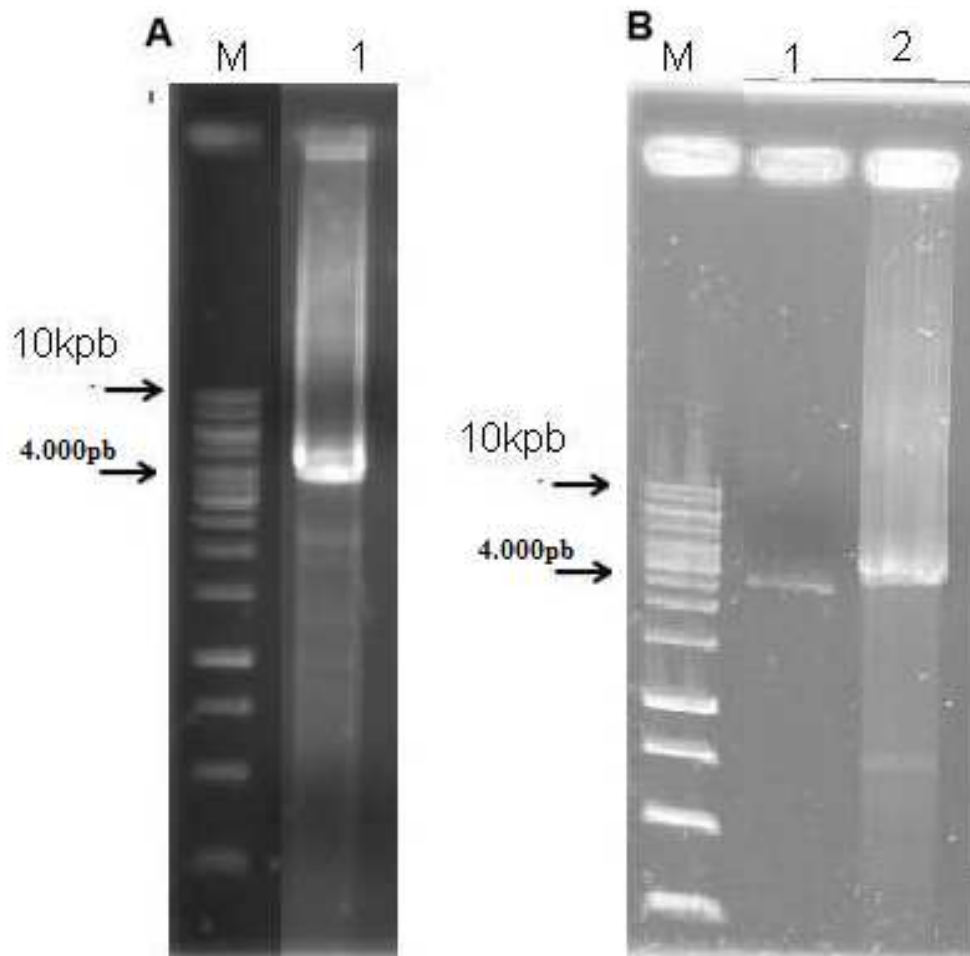
A subclonagem do *cassette* p35S-RNA2-HDV em pCAMAP foi programada utilizando sítio de restrição presente no sítio múltiplo de clonagem do pCAMAP e sequência *blunt end* no inserto. Primeiramente, o vetor pCAMAP foi preparado pela digestão com PacI e, posteriormente, as extremidades digeridas com *Mung bean nuclease* para gerar extremidades abruptas, ou seja, *blunt end* (Sambrook *et al.*, 1989). A reação foi terminada adicionando SDS na concentração final de 0,01%. Após a reação, o DNA foi precipitado com etanol e foi resuspendido e, em seguida, digerido com AscI. Após a digestão, o DNA contendo as extremidades AscI e *blunt end* foi purificado a partir do gel de agarose 0,8% corado com cristal violeta. O RNA2 foi preparado de modo similar a pCAMAP, utilizando a enzima PmeI no lugar de PacI. Estes fragmentos foram reunidos em um eppendorff sobre ação da enzima ligase e, posteriormente, transformados em *E. coli*. Assim, o clone P35S-RNA2-HDV passa a ter um único sítio para PacI na altura da região 3'UTR que se complementa com a mesma região em RNA1.

### **3.5. Modificação cDNA RNA1 via PCR e recuperando o fragmento inteiro de RNA1 do isolado CAM**

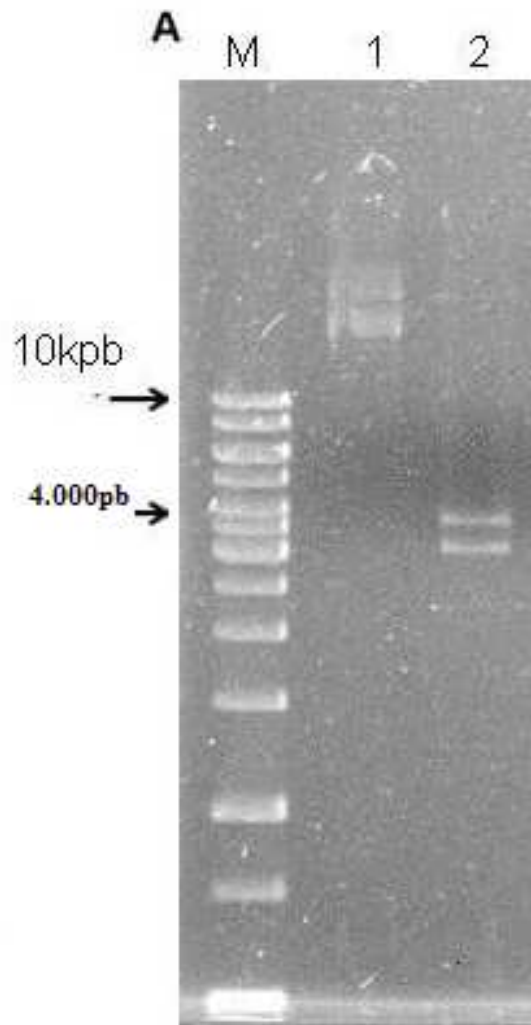
A partir da confirmação por seqüenciamento da integridade do clone, iniciou-se a modificação do clone PepRSV RNA1 1-5, com a adição do promotor 35S de CaMV, por meio de *Overlap-extension* PCR (PCR de fusão). Para direcionar essa técnica os fragmento de PepRSV RNA1 1-5 e 35S CaMV apresentam uma região de sobreposição (*overlap*) de 40 nucleotídeos que auxiliam na confecção da *template*. Após a amplificação do fragmento do DNA do RNA1 1-5 fusionado com 35S (Figura 14), este foi clonado em vetor comercial pGEM-T Easy.

A modificação da extremidade 3' do RNA1, RNA1 1-3, com a adição de 54 nucleotídeos do sítio de ribozima HDV, após a região 3'UTR, foi inicialmente selecionada em gel de agarose 0,8% a partir do tamanho estimado para o fragmento, quando esse foi liberado do vetor comercial (Figura 15). O resultado esperado foi congruente com o tamanho observado de 3800bp. Para validar esse resultado os clones foram consecutivamente seqüenciados e identificados a partir do algoritmo Blast.



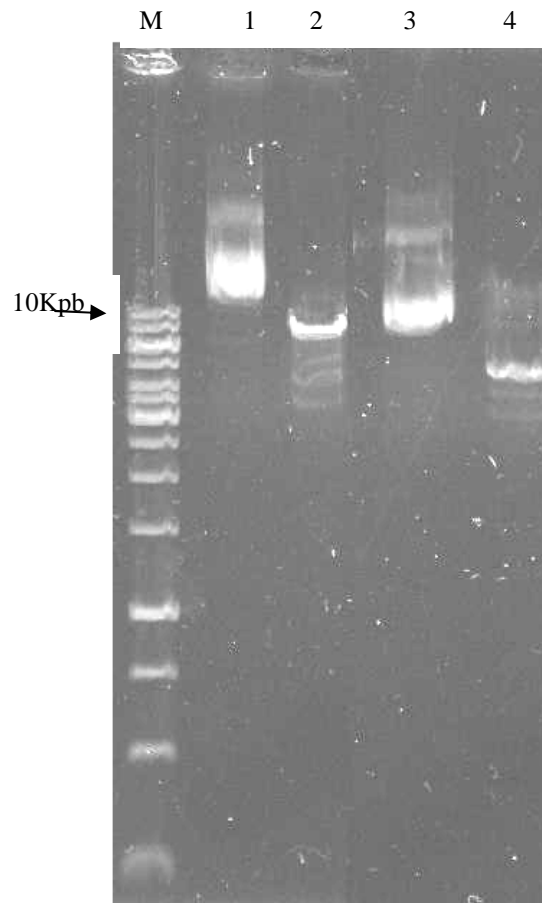


**Figura 14. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio. Amplificação do cDNA de PepRSV RNA2 e 35S. A1: Resultado da 2ª etapa da fusão usando enzima LongAmp. B: Comparação entre o inserto em PCR com o produto fusionado; B1: fragmento não fusionado B2: fragmento fusionado. M=DNA ladder 1kb (Fermentas).**

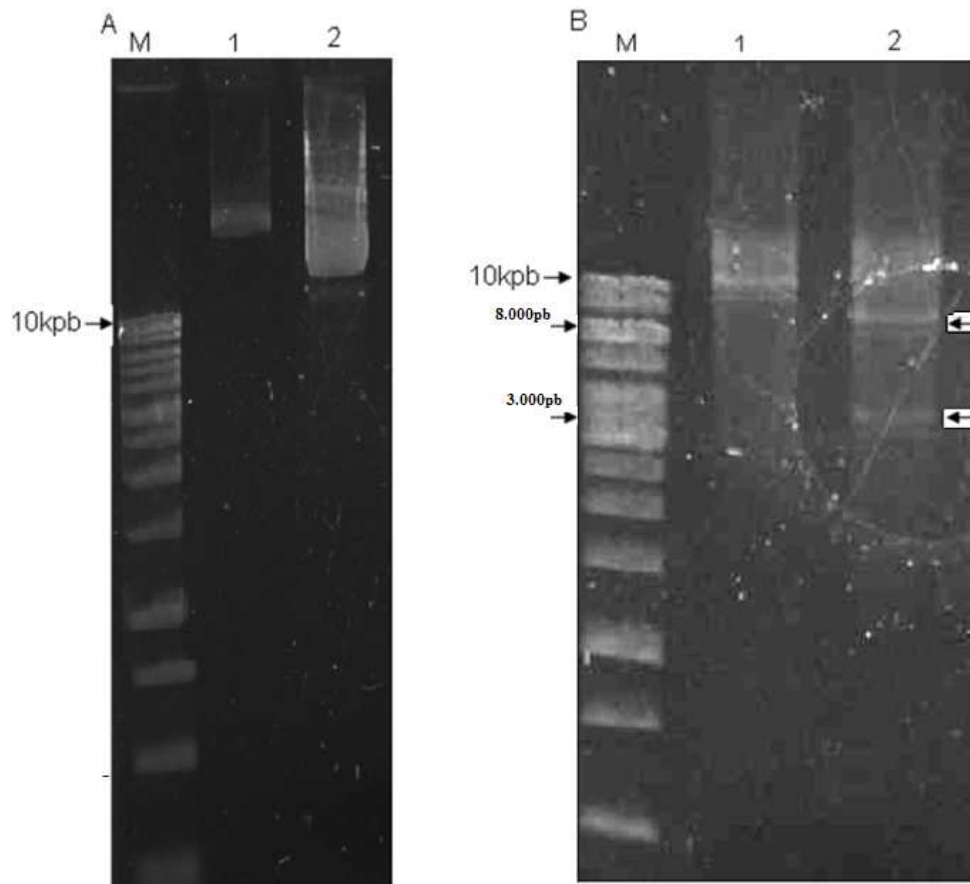


**Figura 15. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, dos clones selecionados para o RNA1 1-3 em fusão com 35S. A. plasmídio pCR4 RNA1 1-3: dois plasmídeos purificados sem digestão enzimática e digeridos com EcoRI. A1. PepRSV RNA1 1-3 clone 1, sem digestão; A2 digestão com EcoRI. M=DNA ladder 1 kb (Fermentas).**

Para reunir os fragmento do cDNA do RNA1, inicialmente durante a obtenção do cDNA pela técnica RT-PCR utilizou-se um sítio de restrição comum aos vetores comerciais pCR4-TOPO e pGEM-T, PmeI, juntamente com o sítio para XbaI presente na constituição genômica do RNA1 do isolado CAM. Separaram-se esses fragmentos por eletroforese (Figura 16) em seguida, foram eluídos por meio do *PureLink Gel extraction kit* (Invitrogen) de acordo com as orientações do fabricante. O plasmídeo foi fechado (17A). Posteriormente, confirmou-se também por eletroforese a liberação do fragmento de aproximadamente 8 kpb e o vetor comercial com 3 kpb (Figura 17B).



**Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, dos clones selecionados para o RNA1 1-3 e pGEM-T 35S-RNA1 1-5 digeridos com XbaI e PstI. 1. plasmídeo fechado; 2. Plasmídeo pGEMT 35S- RNA11-5 digerido; 3. Plasmídeo fechado; 4. cDNA RNA1 1-3. M=DNA ladder 1kb plus (Invitrogen).



**Figura 17. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, dos clones selecionados para pGME-T - RNA1 PepRSV. A. clones selecionados a partir da clonagem de pGME-T 35S- RNA1 1-5 e cDNA RNA1 1-3. B. A partir da seleção do clone 1 da Figura A procedeu-se à digestão para linearizar a construção com PacI. Na coluna 2 observa-se o resultado da digestão com AscI e PacI. M=DNA ladder 1 kb (Fermentas).**

### 3.6. Atribuições infectivas ao cDNA do isolado CAM

Para confirmar a identidade e integridade das quimeras pGEM-T AscI-35S-PepRSV RNA1-PacI-HDV e pCAMAP e p35S-RNA2-HDV, os clones previamente selecionados por uma digestão com AscI e PacI geraram dados nucleotídeos através do sequenciamento automático pela empresa Macrogen (Coréia do Sul). Esses clones foram avaliados pelo programa Staden Package (Staden *et al.*, 2003) e analisados utilizando o algoritmo Blast. Em relação à identidade, os clones mostraram coerência, mas de acordo com a integridade, uma mudança nucleotídica presente na cauda de HDV inviabiliza a conformação dessa proteína.

A mutação na sequência de ribozima de HDV pode ter sido inserida durante o processo de PCR, por erro de incorporação. Uma substituição nucleotídica foi observada na posição 32 nt (de 54 nt de ribozima). Essa modificação poderia ser significativa, podendo levar à perda da função da ribozima, devido à possibilidade de mudança da sua estrutura secundária. Os esforços não foram contidos, buscou-se no desenvolvimento de novos oligonucleotídeos, que continham a sequência de ribozima de HDV (HDV PacI Rev) em sua estrutura, tentar solucionar esse problema, mas a mutação persistia.

Uma alternativa foi substituir a cauda de HDV pela cauda de outra ribozima de *Subterranean clover mottle virus satellite* (RZsSCMoV), já fusionada em um outro vetor expressão. Para tanto, utilizou-se o backbone do vetor pCAMBIA-TRV-RNA2 (pTRV2-MS: pYL156) (Figura 9). Por se tratar de uma praga quarentenária ausente no Brasil, o RNA2 de TRV foi utilizado em detrimento ao RNA1 pela ausência de genes estruturais capazes de promover e manter a infecção sistêmica em plantas hospedeiras. O arcabouço desse segmento genômico foi mantido com a intenção de manter ribozima *Subterranean clover mottle virus satellite* (RZsSCMoV), fusionada em vetor pCAMBIA.

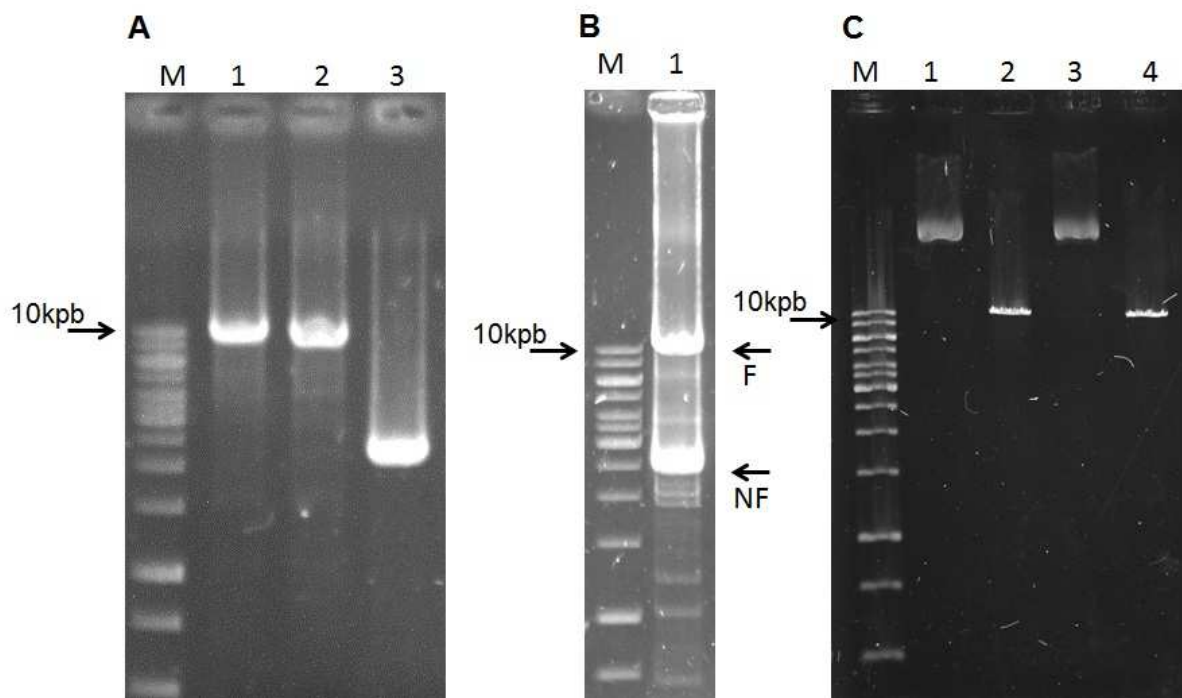
Para esse exercício utilizou-se o *backbone* do vetor pCAMBIA-TRV-RNA2 (pTRV2-MS: pYL156). Os dois fragmentos, P35S-RNA2 e *backbone* do pTRV-RNA2 (RZsSCMoV-pCAMBIA) foram amplificados separadamente por PCR utilizando Phusion DNA polymerase (Figura 18A). Depois estes fragmentos foram fusionados como mostra a Figura 12B. Após a ligação em plasmídeo vetor, foram transformados em *E. coli* (Figura 18C). Essa clonagem foi confirmada por sequenciamento.

Com a intenção de construir o cDNA do RNA1 do PepRSV em vetor binário P35S-RNA1-RZsSMoV-pCAMBIA, esforços foram concentrados em reunir os fragmentos de PepRSV RNA1 1-5 + 35S com PepRSV RNA1 1-3 + AscI em um único vetor, pGEM-T

Easy, para em seguida subcloná-lo em P35S-RNA2-RZsSCMoV-pCAMBIA em substituição ao RNA2 através dos sites de AscI e PacI (Figura 7).

Inicialmente, pensou-se em substituir a região 3' do RNA 1 pela região 3' do RNA 2 de PepRSV, devido à identidade existente na extremidade 3' entre esse segmento genômico e com a finalidade de remover erros obtidos durante a modificação do RNA 1 1-3. Assim, removeu-se o inserto de RNA2 utilizando as enzimas PacI e AscI do clone pCAMAP-RNA2-PepRSV (clone 28) e subclonou-se em P35S-RNA2-RZsSCMoV-TRV-pCAMBIA (Figura7).

A próxima etapa foi a inserção dos segmentos RNA1 1-5 e RNA1 1-3 em um único vetor plasmidial. Para esta clonagem, selecionou-se o sítio PstI (presente no vetor plasmidial) e XbaI (no inserto) e utilizou-se os clones P35S-RNA1 1-5 em pGEM-T e o RNA1 1-3-HDV em pCR4. Para essa construção, o clone P35S-RNA1 1-5-pGEM-T foi submetido a digestão inicial como XbaI em tampão NEB 4. Em seguida, o DNA foi purificado por precipitação com etanol. Posteriormente o DNA foi digerido com PstI em tampão NEB 3, separado por eletroforese e eluído do gel de agarose. O inserto RNA1 1-3-HDV foi separado do vetor pCR4 com mesmas enzimas XbaI e PstI como descrito na preparação de P35S-R1-5-pGEM-T. Esses fragmentos foram ligados com T4 DNA ligase, transformados em *E. coli* DH10B e após, confirmados por meio do sequenciamento.



**Figura 18. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, do cDNA do PepRSV RNA2 por PCR de fusão. A.** Amplificação do *backbone* do pTRV e RNA2. Poços 1 e 2=Backbone do pTRV; poço 3= amplificação de RNA2. **B.** Fusão por PCR. Poço 1=DNA fusionado de (???) *backbone* do pTRV e P35S-R2. **C.** Clones P35S-R2-RZsSCMoV. Poços 1 e 3=clones 1 e 2. Poços 2 e 4= clones 1 e 2 linearizados com *AscI*. M=DNA ladder 1kb plus (Invitrogen). N=fusionados, NF= fragmentos não fusionados.

#### 4. Discussão

Esse trabalho relata a construção do cDNA do isolado CAM de PepRSV com atribuições infectivas via *Agrobacterium*. O construção dessa ferramenta molecular marca o início do desenvolvimento de uma nova técnica em recursos de genética reversa para estudos com PepRSV.

A ferramenta proposta consiste em introduzir na maquinaria vegetal, genes de interesse de forma transiente, sem a característica de hereditariedade. A alta replicação viral e a rapidez em que ocorre são fatores que tornam esse vetor especialmente atraente. Dentre os vários vetores virais de plantas, destacam-se *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Potato virus X* (PVX), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Tobacco rattle virus* (TRV) (Yusibov, et al., 1999; Gleba e Klimyuk, 2007; Matsuo e Hong, 2007; Liu *et al.* 2004) que, normalmente, sintetizam proteínas virais capazes de suprimir o silenciamento gênico, mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas em resposta a infecção e ocorre a partir da degradação de mRNA (RNA mensageiro) do gene alvo.

Inicialmente, tentamos recuperar de forma íntegra ambos os segmentos genômicos do isolado CAM utilizando a técnica de RT-PCR. No entanto, a recuperação do RNA1 completo foi falho. Para sanar essa primeira dificuldade, dividimos o segmento genômico do RNA1 em dois fragmentos menores por meio de *primers* internos. A amplificação desses fragmentos foram mantidas em vetor comercial assim como o cDNA RNA2 durante a modificação pela adição de promotor e cauda de ribozima, pois a eficácia de vetores de proteínas de expressão requer estabilidade quanto à produção de proteínas pelo acúmulo considerável de RNA genômico (Lacomme *et al.*, 2003).

Para essa metodologia aplicou-se durante o processo de clonagem o promotor 35S CaMV *upstream* a região 5'UTR de ambos os segmentos genômicos pela técnica de *overlap-extension PCR*. Essa técnica é baseada na sobreposição de sequências entre dois fragmentos envolvidos. Nessa fase não pode haver vulnerabilidade entre o final de sequência e o início da outra, pois os pontos devem ser protegidos pela transição.

Segundo Sharma e Sharma (2005) também é necessário de um terminador a *downtream* que associado ao promotor atívem as características de infecção dentro do sistema vegetal, para complementar o ciclo viral em condições experimentais. A essa proposta buscou-se em *Hepatitis Delta virus* (HDV), um RNA auto-catalítico que apresenta um mecanismo de replicação comum aos vírusóides, como estrutura de molécula secundária circular forte e estável (Eiras *et al.*, 2006). No entanto, uma mutação pontual na cauda de



HDV foi observada, com a possibilidade de mudar a conformação bidimensional dessa proteína e, conseqüentemente a uma alteração na função.

Novos *primers* foram sintetizados, mas não resultaram na perfeita integridade da sequência. Portanto, adotou-se o mesmo arcabouço utilizado para o vetor de expressão de TRV, ou seja, um vetor binário pCAMBIA já modificado com a adição ribozima que, nesse caso é *Subterranean clover mottle virus satellite* (sSCMoV) (Liu *et al.*, 2004).

Após a modificação do cDNA de RNA1 e RNA2 encontrou-se um novo desafio durante a subclonagem do vetor comercial para o vetor binário. Na porção 3'UTR de RNA1 e RNA2 há um sítio de restrição para *PacI*, o que aparentemente inviabilizaria a técnica, pois esse mesmo sítio foi adicionado durante amplificação do cDNA. Assim buscou-se na técnica de preenchimento das extremidades coesivas por endonucleases uma possível eliminação do vetor *PacI* inserido via PCR e, continuou-se com o desenvolvimento do clone com características de infecção.

Para inserir essas construções na maquinaria vegetal adotamos o sistema ATTA. Sistema "*Agrobacterium tumefaciens* transiente assay" que tem sido utilizado com sucesso para expressar genes repórteres em tecidos de folhas de *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus acutifolius*, *Lactuca sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* e *Linum usitatissimum* (Wroblewski *et al.*, 2005). Essa técnica é bastante promissora, quando comparada às outras estratégias. Isso se deve também ao fato de ser rápida, sem necessidade de regeneração de plantas das células transformadas, e, portanto, útil para avaliar a expressão de construções múltiplas (Wroblewski *et al.*, 2005), pois os genes transferidos por esse sistema são codificados no genoma de um plasmídeo (molécula de DNA extracromossômico com capacidade de replicação), independente da organização genômica do *Agrobacterium* (Wroblewski *et al.*, 2005).

### CAPÍTULO III

#### CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOIS NOVOS ISOLADOS DE PepRSV

##### Resumo.

Análises de sequências de RNA2 de dois novos isolados de *Pepper ringspot virus* (PepRSV), Pivo 4 e Lavrinha, coletados dos campos de tomateiro em Luziânia (GO), Brasil, revelaram alta identidade entre estes e o isolado original do vírus, CAM de Campinas (SP). A análise filogenética baseada na comparação de sequências de aminoácidos (aa) da capa proteica entre os três isolados (Pivo4, Lavrinha e CAM) de PepRSV não foram capazes de separar Pivo 4 e Lavrinha em grupo distinto do isolado CAM, pois a inferência do algoritmo correspondente *bootstrap* foi irrelevante. Todos isolados apresentaram ORF para capa proteica (CP), mas não apresentaram homólogos das ORFs 2a e 2b do TRV associados à transmissão do vírus por nematoides no campo. A comparação entre os três isolados sugere a inserção muito grande após o ORF do CP em isolados Pivo4 e Lavrinha em relação com o isolado CAM e a recombinação na região 3'UTR entre as moléculas de RNA2 e RNA1 dos próprios isolados.

## 1. Introdução

O gênero *Tobravirus* está representado por três espécies distintas considerando a homologia entre as moléculas de RNA1 demonstradas por hibridização, no entanto, essa similaridade não é restrita ao RNA1. Robinson e Harrison (1985) identificaram complementaridade também entre moléculas de RNA2. Já Sanger (1968), foi um pouco mais audacioso e, demonstrou a formação de pseudo-recombinates entre as partículas de RNA1 e RNA2 dos isolados da mesma espécie. Em 1991, Goulden e colaboradores demonstram recombinação entre dois tobavírus diferentes, como o RNA2 do isolado TCM de TRV tem o terminal 5' derivado do RNA2 de TRV, a porção central provavelmente derivada do RNA2 de PEBV e a região 3' do RNA1 de TRV.

O genoma de tobavírus tem revelado dois genomas. O RNA1 que contém duas ORFs grandes associadas à replicação viral e, imediatamente a *downstream* duas ORFs menores (1a e 1b) que codificam proteínas de movimento e um supressor de silenciamento, respectivamente (Robinson, 2005). O RNA2, mantém similaridade entre a 5'UTR e 3'UTR de RNA1, mas variam entre os isolados de tobavírus mostrando diferenças consideráveis de tamanho e organização genômica.

Para o RNA2, tem-se, atualmente, a informação nucleotídica de 22 isolados de TRV, cinco de PEBV e um de PepRSV disponíveis em bancos de dados de domínio público, que fornecem dados genotípicos associados codificação da capa proteica (CP) e uma ou duas proteínas não estruturais (2a e 2b) envolvidas com a transmissão por nematoide do gênero *Trichodorus* e *Paratrichodorus* (MacFarlane *et al.*, 1996; Ploeghet *et al.*, 1991; Almeida, 2005).

O produto gênico da ORF 2b é necessário para transmissão por nematoides, enquanto o produto 2c aumenta a eficiência da transmissão de *Pea early-browning virus* (PEBV) por *Trichodorus primitivus* (MacFarlane, 1999), o que não pode ser considerado como regra, pois em TRV, isolado Ppk20, alterações nucleotídicas no cDNA não interferiram na eficiência de transmissão via nematoide *Paratrichodorus pachydermus* (Hernández *et al.*, 1997)

Existem alguns isolados com estratégias genômicas incomuns para o RNA2 de TRV (Ashfaqet *et al.*, 2011). Isolados que não possuem o gene relacionado à transmissão (gene 2b do RNA2) o qual pode ser gerado com a inoculação mecânica repetida, por propagação vegetativa e por infecção via semente (Hernández *et al.*, 1996).

No caso de isolados de PepRSV, não há informação sobre a heterogeneidade da sequência do RNA2 pela falta de sequências disponíveis de outros isolados, exceto o isolado CAM (oriundo de Campinas). Recentemente, dois isolados de PepRSV (isolados Lavrinha e

Pivo4, coletados em Luziânia, GO, Brasil) de tomateiro foram encontrados. Neste estudo, o segmento de RNA2 dos dois isolados foi sequenciado e comparado com o isolado original de pimenta de PepRSV (isolado CAM).

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Isolado viral e condições de manutenção

O isolado Pivo 4 e Lavrinha foram coletados em campos de tomateiro (figura 2) no ano de 2012 por apresentarem sintomas parecidos com o de isolado CAM do PepRSV. Os dois isolados de PepRSV foram obtidos de lavouras distantes cerca de 10 Km. Estes isolados foram mantidos no freezer -80°C e em plantas de *Capsicum annuum* Ikeda e tomateiro por até duas gerações.

### 2.2. Extração do RNA total

Para esse estudo, o RNA total do isolado Lavrinha e Pivo 4 foi extraído a partir de folhas com sintomas de *Capsicum annuum* Ikeda e de tomateiro em aproximadamente 14 dias após-inoculação utilizando a solução “Plant RNA reagent” (Invitrogen), conforme as orientações do fabricante.

### 2.3. Síntese do cDNA viral e amplificação de Pivo 4 e Lavrinha

O oligonucleotídeo antissenso PepRSV-3' Cloning +HDV5' Half Rev (P2) (tabela capítulo II) (5'GCCAGCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCgggcgtgataacgttcacgg -3'), que foi utilizado durante a síntese de cDNA de RNA2 do isolado CAM de PepRSV foi utilizado para esses dois novos isolados, Pivo e Lavrinha. A transcrição reversa foi realizada com 5µl de RNA total, 1µl de dNTPs de 10mM, 1µl de *primer* PepRSV-3'Cloning +HDV5'Half Rev (P2) (50mM) (tabela 1) e 5µl de água Milli-Q autoclavada. A reação foi aquecida a 75°C por 5 minutos e resfriada no gelo por mais 5 minutos; em seguida, foi adicionado à reação 4µl de tampão 5X FS, 2µl de DTT (0,1M), 1µl de RNase OUT e 1µl da enzima transcriptase reversa Superscript III (200u/µl) (invitrogen). A extensão de cDNA foi feita em 48°C por 60 minutos. A reação da enzima *Superscript* III foi inativada a 75°C por 15 minutos. Para amplificar 50µlcDNA de Pivo4 e Lavrinha utilizamos 1µl do primer P3 (10mM) (Tabela 1 Capítulo II) 1µl do Primer P2, 5µl do cDNA, 10 µl de dNTP (2,5mM), 5 µl de tampão 5X “Reaction buffer” (60 mM Tris-SO<sub>4</sub> em pH 9.0, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 mM MgSO<sub>4</sub>), 2.0µl de LongAmp DNA Polymerase. A PCR foi feita nas seguintes condições

80°C por 1 minuto (1 ciclo), 94°C por 2 minutos (1 ciclo), passando a seguir por 35 ciclos, sendo cada um deles composto por uma desnaturação das fitas a 94°C por 15 segundos, anelamento dos iniciadores a 56°C por 1 minuto e, no último ciclo, extensões a 65°C por 2 minutos. Concluído os 35 ciclos a temperatura permaneceu a 65°C por 10 minutos (1 ciclo). Os fragmentos amplificados foram purificados a partir de gel de agarose a 0,8 % (p/v) corado com violeta cristal (40µg/mL) utilizando o kit o “PureLink Gel extraction”(Invitrogen), segundo as orientações do fabricante e clonado em vetor comercial pGEM-T Easy (Promega).

#### **2.4. Sequenciamento do RNA2 dos dois isolados novos de tomateiro de PepRSV**

Com a confirmação parcial obtida a partir de uma análise feita em gel de agarose a 0,8 % (p/v) corado com brometo de etídio de uma altura estimada em 1.700 a 2.000pb após a liberação do inserto com enzimas de restrição para EcoRI. Os clones assim selecionados foram sequenciados na plataforma Macrogen (Coréia do Sul).

Os dados nucleotídeos gerados a partir da plataforma Macrogen foram analisados por alinhamento múltiplo utilizando ClustalW(<http://www.ebi.ac.uk>) (Larkin, *et. al.*, 2007) e visualizados na forma árvore filogenética, construída utilizando o método Maximum-likelihood, algoritmo implementado em MEGA5 (Tamura, *et. al.*, 2011) com *bootstrap* de 1000 replicações.

### 3. Resultados

#### 3.1. Análise de RT-PCR e detecção de RNAs

O RNA total de planta infectada foi utilizado como template para RT-PCR usando o oligonucleotídeo P2 (tabela 2) (correspondendo a 39nts no final do RNA1 e 2 do isolado CAM de PepRSV) e o P3 (Tabela 2) (correspondendo a 59nts na região 5'UTR de PepRSV). O produto de cada reação foi analisado em eletroforese de gel de agarose 0,8% (p/v).

Os fragmentos de RNA2 obtidos desses dois isolados foram mais longos que o do isolado CAM (1.799nts), por causa da maior inserção da região 3'UTR (anexo 2). É possível que os vários exemplos de heterogeneidade do RNA2 de TRV foram originados de inoculações mecânicas sequenciais durante a manutenção do isolado. Para evitar esses mutantes artificiais, especialmente os mutantes de deleção, as amostras utilizadas para a realização do RT-PCR e clonagem subsequente foram retiradas diretamente da planta do campo (isolado Lavrinha), ou inoculadas mecanicamente uma vez em uma planta indicadora (pimentão, isolado Pivo4) em casa de vegetação. Os quatro clones tiveram a RNA2 completamente sequenciados em cada isolado para reduzir os riscos de obtenção de seqüências com erros advindos da RT-PCR. Assim, foi possível concluir que as diferenças na região 3'UTR do RNA2 entre os dois isolados não seriam artefatos do processo de clonagem.

#### 3.2. Sequenciamento de RNA2 dos novos isolados de *PepRSV*

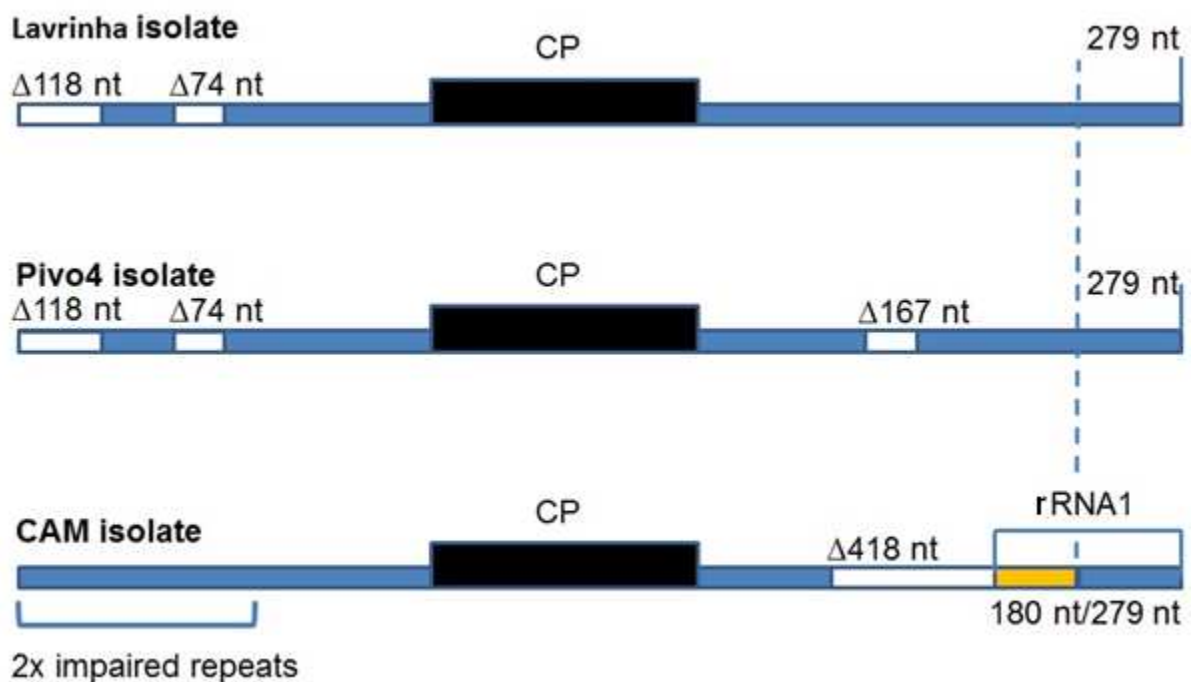
O RNA2 do isolado Lavrinha apresentou tamanho de 2.042nts, enquanto o do isolado Pivo4 apresentou 1.875nts. Em ambos os isolados, somente a ORF do CP foi detectada, diferentemente da seqüência de TRV e PEBV.

Os últimos 459nts do 3'UTR do RNA2 do isolado CAM são 100% idêntico aos do RNA1 do mesmo isolado, portanto possivelmente um produto de recombinação (Bergh, *et al.*, 1985). Nos novos isolados, a identidade entre a extremidade 3' do RNA1 e RNA2 do mesmo isolado ainda é desconhecida, pois a seqüência do RNA1 dos novos isolados não foi determinada. A região a montante dos últimos 279nts do RNA2 dos isolados de tomate em comparação com o isolado CAM foi distinta (Figura 12). Não foi observada similaridade entre essa região do isolado CAM e qualquer seqüência do banco de dados de nucleotídeos. Entretanto, os isolados Lavrinha e Pivo4 apresentaram uma alta identidade, exceto pela deleção de cerca de 170nts no isolado Pivo4 em relação ao isolado Lavrinha. Para aumentar o

entendimento dessas sequências, a região 3' terminal do RNA1 dos dois isolados está sendo sequenciada.

A região 5' UTR dos novos isolados apresentou diferenças significativas em relação ao isolado CAM, os primeiros 390nt apresentam uma região com duas sequências repetidas imperfeitas (AA'BB'). Entretanto, essas sequências repetidas não foram observadas nos novos isolados (Figura 12), possivelmente produzidos por deleções em relação ao isolado CAM.

Apesar dessas diferenças, foi verificada uma característica similar. O isolado CAM apresenta 12 códon de iniciação não funcional antes do códon funcional. Nesse vírus, a CP do RNA2 é expressa via RNA subgenômico. Os novos isolados também apresentam um alto número de AUGs, sete no isolado Lavrinha e oito no isolado Pivo4. Mesmo com a ausência das sequências repetidas, acredita-se que os novos isolados de PepRSV também utilizam da estratégia de RNA subgenômico para a transcrição de gene da CP.



**Figura 19. Representação esquemática do RNA2 dos isolados CAM, Pivo4 e Lavrinha.** As sequências específicas de RNA2 estão representadas por barras e as posições de deleção pelo símbolo  $\Delta$ .



Muitas diferenças foram observadas nas regiões não codificantes (5'UTR e 3'UTR) entre CAM e os novos isolados, porém a sequência de aminoácidos da CP mostrou-se altamente conservada (Fig. 15). A CP dos três isolados é composta de 223 aminoácidos (aa) e identidade entre os isolados CAM e Lavrinha de 97,3% e CAM e Pivo4 de 97,8%. A identidade entre Lavrinha e Pivo4 é de 97,8%. A análise filogenética da sequência de aminoácidos da CP utilizando o método Maximum-likelihood (MEGA5) não mostrou uma ramificação clara entre os isolados (Fig. 16). O isolado CAM foi detectado e coletado em finais dos anos 60 (Kitajima e Costa, 1969). Curiosamente, em mais de 50 anos, a sequência da CP manteve-se altamente conservada. Isso sugere a importância da CP em funções vitais do vírus, provavelmente relacionada à transmissão por nematoides. Os vetores de PepRSV não são bem conhecidos, porém, *Paratrichodorus minor* (*Trichodorus christiei*) é relatado como o seu vetor natural. Neste estudo, o RNA2 de dois novos isolados de PepRSV foi sequenciado e somente a ORF da CP foi detectada. É provável que PepRSV utiliza-se de um mecanismo de transmissão distinto de TRV que não necessita das demais ORFs como os genes de 2be 2c.

```

Lavrinha-CP      MAMYDDEFDTKASDLTFSPWVEVENWKDVTTRLRAIKFALQADRDKIPGVLSDLKTNCPY 60
Pivo4-CP        MAMYDDEFDTKASDLTFSPWVEVENWKDVTTRLRAIKFALQADRDKIPGVLSDLKTNCPY 60
CAM-CP         MAMYDDEFDTKASDLTFSPWVEVENWKDVTTRLRAIKFALQADRDKIPGVLSDLKTNCPY 60
*****

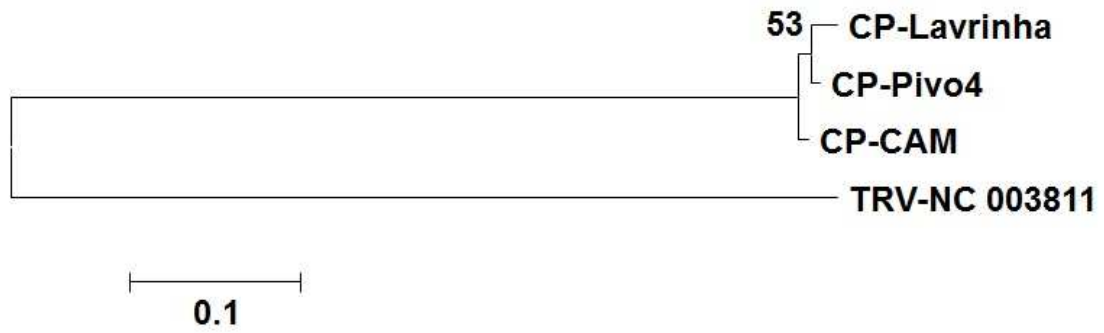
Lavrinha-CP      SAFKRFPDKSLYSVLPKEAVMAVAQIQAAAFKRRRADEKNAVSGLVSVTPTQISQSASSS 120
Pivo4-CP        SAFKRFPDKSLYSVLPKEAVIAVAQIQAAAFKRRRADEKNAVSGLVSVTPTQVSQSASSS 120
CAM-CP         SAFKRFPDKSLYSVLSKEAVIAVAQIQSASGFKRRRADEKNAVSGLVSVTPTQISQSASSS 120
*****

Lavrinha-CP      AATPVGLATVKPPRESDSAFQEDTFSYAKFDDASTAFHKALAYLEGLNLRPTYRRKFEKD 180
Pivo4-CP        AATPVGLATVKPPRESDSAFQEDTFSYAKFDDASTAFHKALAYLEGLSLRPTYRRKFEKD 180
CAM-CP         AATPVGLATVKPPRESDSAFQEDTFSYAKFDDASTAFHKALAYLEGLSLRPTYRRKFEKD 180
*****

Lavrinha-CP      MNVKWGGSGSAPSGAPAGGSSGSAPPTSGSSGSGAAPAPPPNP 223
Pivo4-CP        MNVKWGGSGSVPSGAPAGGSSGSAPPTSGSSGSGAAPTPPPNP 223
CAM-CP         MNVKWGGSGSAPSGAPAGGSSGSAPPTSGSSGSGAAPTPPPNP 223
*****

```

**Figura 20. Alinhamento múltiplo em aminoácido da capa proteica dos três isolados de PepRSV.**



**Figura 21.** Árvore filogenética obtida a partir de aminoácidos presente na ORF da capa protéica dos isolados de PepRSV.

#### 4. Discussão

O estudo da variabilidade nucleotídica do RNA2 de PepRSV foi apenas iniciado. Neste estudo, os dois isolados apresentaram uma extremidade 5' e a 3' divergentes quando comparado com o isolado CAM. As duas sequências repetidas em *tandem* (AA'BB') não foram encontradas na região 5'UTR dos novos isolados Lavrinha e Pivo4. A fácil detecção de uma pluralidade de diferentes moléculas de RNA2 de PepRSV pode estar associada a uma inconsistência nucleotídica durante o anelamento do iniciador na técnica de PCR em virtude da presença de dois sítios de 118 nucleotídeos combinados com 2 sítios de 79 nucleotídeos na região 5'UTR o que pode ter mascarado o resultado.

A extremidade 3' do RNA2 do isolado CAM é provavelmente originada de um evento de recombinação, sendo que o RNA1 e o RNA2 desse isolado compartilham da mesma sequência nessa região de 459nts. A surpresa foi encontrar que a 3'UTR dos dois novos isolados de PepRSV apresentam uma sequência a montante da extremidade de 279nts (conservada entre os três isolados) divergente com o isolado CAM.

Entretanto, considerando as particularidades do procedimento de amplificação e clonagem dessa região genômica, uma nova repetição de todo o processo precisa e será realizada para confirmar os resultados obtidos. No entanto, devido à possibilidade do primer se anelar na segunda sequência repetida, o procedimento de 5' RACE foi realizado. O resultado foi negativo e será repetido até a obtenção da confirmação dessa sequência.

A extremidade 3' do RNA1 dos dois novos isolados precisa ser estudada para se avaliar se eles compartilham da mesma propriedade de possuir alta identidade nessa região. As clonagens da extremidade 3' do RNA1 desses isolados estão em andamento atualmente. Finalmente, a ausência da ORF 2b e 2c nos três isolados é intrigante. A construção do clone infeccioso e o seu uso para a realização de testes de transmissão por nematoides (*Paratrichodorus* spp.) serão alvos dos próximos estudos.

Por enquanto podemos especular sobre um possível mecanismo evolutivo. As recombinações presentes entre sem sentido no RNA2 dos isolados Lavrinha e Pivo4 podem ter sido selecionadas em detrimento ao ambiente hostil ou que confere uma flexibilidade genômica de PepRSV, parecida com a adquirida por TRV (Hernández *et al.*, 1966).

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

---

A obtenção do cDNA completo do isolado CAM de PepRSV nomeado com cDNA de RNA1 e RNA2 foi realizada em várias etapas em adição a um promotor 35s de CaMV na região 5'UTR e uma ribozima na região 3'UTR. A necessidade de mudanças ao longo do processo foi dispendioso e desgastante, fato esse que hoje poderia ter sido minimizado, em parte, com a síntese de nucleotídeos em detrimento a obtenção *in vivo*. Mas os protocolos estabelecidos, modificados e ajustados para atender a necessidade servirão de estratégias para o desenvolvimento de clones futuros.

O clone obtido quando analisado em relação a sua capacidade de infecção via *Agrobacterium* torna-se uma ferramenta valiosa para viabilizar: o estudo da interação entre o nematoide e o vírus; o estudo do mecanismo utilizado pelo RNA1 de invadir sistemicamente a planta sem a necessidade da formação de partícula; e o entendimento da relação das partículas com as mitocôndrias e o seu envolvimento com o mecanismo de defesa da planta contra a infecção.

Também poderá ser almejado como sistema de expressão de proteínas exógenas em plantas, atribuindo assim o seu valor comercial, ou seja, avaliado como vetor VIGS para identificar funções de genes em organismo hospedeiro.

Acreditamos que o primeiro passo para grandes conquista em PepRSV já foi estabelecido. Além disso, a variabilidade do RNA2 de PepRSV que apenas foi iniciado nesse estudo poderá apresentar diversidades interessantes entre isolados de PepRSV já que esse tem como único representante o isolado CAM.

Isolados encontrados em tomateiros foram diagnosticados como espécimen de PepRSV devido as características morfológicas e, a partir de microscopia eletrônica, apresentam uma associação com as mitocôndrias dos hospedeiros, como mantida para o isolado CAM. Além disso, mantém a ausência dos genes 2b e 2c na sua organização genômica. No entanto, a ausência de 180nts na região de recombinação do RNA2 pode fornecer informações sobre o aspecto evolutivo desse vírus dentro do gênero *Tobravirus*.

Essas novas descobertas podem aproximar ainda mais PepRSV da espécie TRV a ponto de desvendar o verdadeiro ancestral comum desse grupo. Mas, ainda é cedo para posicioná-los em uma árvore filogenética descrevendo grupos monofiléticos, pois o processo de mutação e recombinação estão sendo estabelecidos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., Antoniw, J. e Kreuze, J., 2009. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Arch Virol* 154(12), 1967-72.
- Adrain, C., Creagh, E. M. e Martin, S. J., 2001. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO Journal*, 20, 6627-6636.
- Alberts, B. et al., 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 1.268p.
- Almeida, M. T. S. C. M., 2005. *Trichodoridae, família de nematóides vetores de vírus*. s.l.:RAPP, Volume 13.
- Ashfaq, M., McGavin, W. e MacFarlane, S., 2011. RNA2 of TRV SYM breaks the rules for tobnavirus genome structure. *Virus Research* 160, 435–438.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. e Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410
- Ayala, A. e Allen, M., 1968. Transmission of the California Tobacco Rattle Virus (CTRV) by three species of the nematode genus *Trichodorus*. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 52, pp101-125.
- Bannon, J. O., 1990. Nematode vectors - Transmission of Plant viruses. *Nematology Circular* 178.
- Bergh, S. e Siegel, A., 1989. Intraviral homology and subgenomic RNAs of pepper ringspot virus. *Virology*, 168, 339–343. Bergh, S. T., Koziel, M. G., Huang, S. C., Thomas, R. A., Gilley, D. P. e Siegel, A. 1985. *The nucleotide sequence of Tobacco rattle virus RNA-2 (CAM strain)*. *Nucleic Acids Reserch* 13, 8507-8518.
- Blein, T. Pulido, A. Vialette-Guiraud, A. Nikovics, K. Morin, H. Hay, A. e Johansen, I.E. Tsiantis, M. Laufs, P, 2008. A conserved molecular framework for compound leaf development. *Science*, 322 1835–1839.
- Bos, L. e Van der Want, J., 1962. Early Browning of pea disease caused by a soil and seed-borne virus. *Tijdschr, Plziekt* 68, 368-390.
- Brigneti, G., Martin-Harnandez, A.M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D., Baker, B., e Jones, J.D. 2004. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* 39, 264–272.
- Burch-Smith, T., Schiff, M. L. Y. e Dinesh-Kumar, S., 2006. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142, 21-27.

- Camargo, I. J. B., Kitajima, E. W. e Costa, A. B., 1969. Visualization of the Pepper ringspot virus in Tomato Pollen. *Journal of Phytopathology* 64, 282-285.
- Chung, E., Seong, E., Kim, Y.C., Chung, E.J., Oh, S.K., Lee, S., Park, J.M., Joung, Y.H., and Choi, D., 2004. A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Mol. Cells*, 17, 377–380..
- Constantin, G. D.; Krath, B. D.; MacFarlane, S. A.; Nicolaisen, M.; Johansen, I. E.; Lund, O. S., 2004. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *The Plant Journal* 40, 622–631.
- Constantin, G.D., Gronlund M., Johansen, I.E., Stougaard, J., Lund, O.S., 2008. Virus Induced Gene Silencing (VIGS) as a reverse genetic tool to study development of symbiotic root nodules. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 21, 720–727.
- Costa, A. S. e Kitajima, E. W., 1968. Transmissão do vírus do anel de pimentão através da semente de tomate. 2ª reunião Soc. Bras. Fitopatologia (Viçosa, M.G.).
- Dale, M., Robinson, D. e Todd, D., 2004. Effects of systemic infections with Tobacco rattle virus on agronomic and quality traits of a range of potato cultivars. *Plant Pathol.* 53,788-93.
- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I., Llave, C., 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *Jornal Virol.* 82, 5167–5177
- Dubreuil, G., Magliano, M., Dubrana, M. P., Lozano, J., Lecomte, P., Favery, B., Abad, p. e Rosso, M. N., 2009. Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode. *J. Exp. Bot.* 60, 4041–4050.
- Eamens, A., Wang, M.-B., Smith, N. A. e Waterhouse, P. M., 2008. RNA silencing in plants: Yesterday, today and tomorrow. *Plant Phisiol.* 147, 456-468.
- Edwards, M. C., 1995. Mapping of the seed transmission determinants of barley stripe mosaic virus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8, 906-915.
- Eiras, M., Daròs, J. A., Flores, R. e Kitajima, E. W., 2006. Viróides e Virusóides: Relíquias do Mundo de RNA. *Fitopatologia Brasileira* 31, 229-246.
- Esau, K., 1979. Beet yellow stunt virus in cells of *Sonchus oleraceus* L. and its relation to host mitochondria. *Virology* 98, 1-8.
- Gao, L., Tian, X., Liu, B. e Zhang, F., 2008. The value of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Med* 8(1), 9-15.
- Gaspar, J., Vega, J., Camargo, I. e Costa, A., 1984. An Ultrastructural-Study of Particle Distribution during Microsporogenesis in Tomato Plants Infected with the Brazilian

- Tobacco Rattle Virus. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 62, 372-378.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. e Carter, A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* 18, 1151-5.
- Gleba, Y. e Klimyuk, V., 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol* 18(2),134-41.
- Goulden, M. G., Lomonossoff, G. P., Davies, J. W. e Wood, K. R., 1990. The complete nucleotide sequence of PEBV RNA2 reveals the presence of a novel open reading frame and provides insights into the structure of tobaviral subgenomic promoters. *Nucleic Acids Research* 18, 4507-4512.
- Goulden, M., Lomonossoff, G., Wood, K. e Davies, J., 1991. A model for the generation of tobacco rattle virus (TRV) anomalous isolates: pea early browning virus RNA-2 acquires TRV sequences from both RNA-1 and RNA-2. *Journal Genetics Virology* (72:7), 1751-4.
- Gronlund, M., Constantin, G., Piednoir, E., Kovacev, J., Johansen, I. E. e Lund O.S., 2008. Virus induced gene silencing in *Medicago truncatula* and *Lathyrus odorata*. *Virus Res.* 135, 345–349.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. e Maliga, P., 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25, 989–994.
- Hamilton, W. D. O., Boccara, M., Robinson, D. J. e Baulcombe, D. C., 1987. The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-1. *Journal of General Virology* 68, 2563-2575..
- Harries, P., Palanichelvam, K., Bhat, S. e Nelson, R., 2008. Tobacco mosaic virus 126-kDa protein increases the susceptibility of *Nicotiana tabacum* to other viruses and its dosage affects virus-induced gene silencing. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 21, 1539–1548.
- Harrison, B. e Robinson, D., 1978. The Tobraviruses. *Adv. Virus Res.* 23, 25–77.
- Harrison, B. e Robinson, D., 1986. "Tobraviruses". In: *The Plant Viruses Vol 2, The Rod-Shaped Viruses*, p. 339; eds M.H.V. van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat. *Plenum Press, New York.*
- Hernández, C., Visser, P. B., Brown, D. J. F. e Bol, J. F., 1997. Transmission of tobacco rattle virus isolate PpK20 by its nematode vector requires one of the two non-structural genes in the viral RNA 2. *Journal of General Virology* 78, 465±467.
- <http://viralzone.expasy.org>, s.d.

- Hutvagner, G. e Zamore, P., 2002. A microRNA in a multipleturnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-60.
- Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D., Malnoe, P., 1997. Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *JornalGen. Viro.* 78, 3141-3145.
- Kim, M., Lim, J.H., Ahn, C. S., Kim, G. T., Park, K. e Pai, H. S., 2006. Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 18, 2341-55.
- Kitajima, E. e Costa, A., 1969. Association of Pepper Ringspot Virus (Brazilian Tobacco Rattle Virus) and Host Cell Mitochondria. s.l.:Journal of General Virology 4, 177-181.
- Kitajima, E. e Lovisolo, O., 1972. Mitochondrial aggregates in *Datura* leaf cells infected with *henbane mosaic virus*. s.l.:Journal of General Virology 16, 265-271.
- Kitajima, E. W., Oliveira, A. R. e Costa, A. S., 1969. Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão. s.l.:Bragantia 28, 1-22.
- Lacomme, C., Hrubikova, K. e Hein, I., 2003. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted repeats. *Plant Journal* 34, 543-553.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T.J. e Higgins, D. G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. Nov 1;23(21):2947-8. Epub 2007 Sep 10.
- Liu, Y., Nakayama, N., Schiff, M., Litt, A., Irish, V. F. e Dinesh-Kumar, S. P., 2004. Virus induced gene silencing of a *deficiens* ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol.* 54(5), 701-11.
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W. e Zhang, S., 2007. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant Journal* 51, 941-54.
- Liu, Y., Schiff, M. e Dinesh-Kumar, S., 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal.* 31, 777-786.
- MacFarlane, S. A., 1999. *The molecular biology of the tobnaviruses*. s.l.:Journal of General Virology 80, 2799-2807.
- MacFarlane, S. A., 2003. Molecular determinants of the transmission of plant viruses by nematodes. *Molecular Plant Pathology* 4, 211-215.
- MacFarlane, S. A., 2010. *Tobnaviruses - plant pathogens and tools for biotechnology*. s.l.:MOLECULAR PLANT PATHOLOGY 11(4), 577-583.



- MacFarlane, S. A., Wallis, C. V. e Brown, D. J. F., 1996. Multiple virus genes involved in the nematode transmission of pea early browning virus.. *Virology* 219, 417-422.
- MacFarlane, S. A., Wallis, C. V. e Brown, D. J. F., s.d. Multiple virus genes involved in the nematode transmission of pea early browning virus.. *Virology* 219, 417-422..
- MacFarlane, S. A., Wallis, C. V., Taylor, S. C., Goulden, M. G., Wood, K. R. e Davies, J. W., 1991. Construction and analysis of infectious. *Virology* 182, 124-129.
- MacFarlane, S. e Brown, D. J., 1995. Sequence comparison of RNA2 of nematode transmissible and nematode non-transmissible isolates of pea early browning virus suggests that the gene encoding the 29 KDa protein may be involved in nematode transmission. *J. of General Virol.* 76, 1299-304.
- MacFarlane, S. e Popovich, A., 2000. Efficient expression of foreign proteins in roots from tobavirus vectors. *irology* 267, 29-35.
- Martín-Hernández, A. M. e Baulcombe, a. D. C., 2008. Tobacco Rattle Virus 16-Kilodalton Protein Encodes a Suppressor of RNA Silencing That Allows Transient Viral Entry in Meristems. *Journal of Virology* 82(8), 4064–4071.
- Matsuo, K. e Hong, J. S., 2007. Development of Cucumber mosaic virus as a vector modifiable for different host species to produce therapeutic proteins. *Planta*, 225(2) 277-86.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A., s.d. Ementa: Altera os Anexos I e II da Instrução Normativa nº 52, de 20 de novembro de 2007, que passa a vigorar na forma dos Anexos à presente Instrução Normativa. In.: *Instrução Normativa Nº 41, DE 01 DE JULHO DE 2008.*
- Ordog, S., Higgins, V. e Vanlerberghe, G., 2002. *Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play a role in the hypersensitive response.* s.l.:Plant Physiol 129, 1858-65.
- Ploeg, A. T., Asjes, C. J. e Brown, D. J. F., 1991. *Tobacco rattle virus serotypes and associated nematode vector species of Trichodoridae in the bulb-growing areas in the Netherlands.* s.l.:Netherlands Journal of Plant Pathology 97, 311-319..
- Ploeg, A. T., Mathis, A., Bol, J. F., Brown, D. J. e Robinson, D. J., 1993. Susceptibility of transgenic tobacco plants expressing tobacco rattle virus coat protein to nematode-transmitted and mechanically inoculated tobacco rattle virus. *Journal of General Virology* 74, 2709-2715.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. e Baulcombe, D., 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Jornal.* 25, 237–245.

- Rikhvanov, E. G., Gamburg, K. Z., Varakina, N. N., Rusaleva, T. M., Fedoseeva, I. V., Tauson, E. L., Stupnikova, I. V., Stepanov, A. V., Borovskii, G. B. e Voinikov, V. K., 2007. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture. *Plant Journal* 52, 763-78.
- Robinson, D., 2005. *Tobravirus*. In *Virus Taxonomy*. s.l.: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J, Desselberger, U., Ball, L.A. eds. Elsevier Academic Press..
- Robinson, D., 2005. *Tobravirus*. In *Virus Taxonomy*. *Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J, Desselberger, U., Ball, L.A. eds. Elsevier Academic Press..*
- Robinson, D. e Harrison, B., 1985. *Unequal Variation in the Two Genome Parts of Tobraviruses and Evidence*. s.l.:Journal of General Virology 66, 171-176.
- Robinson, D. e Harrison, B., 1989. *Pepper ringspot virus*. s.l.: CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 347.
- Robinson, D. J., 1983. RNA species of tobacco rattle virus strains and their nucleotide sequence relationships. *Journal of General Virology* 64, 657-665.
- Robinson, D. J., Hamilton, W. D. O., Harrison, B. D. e BAULCOMBE, D. C., 1987. Two Anomalous Tobravirus Isolates: Evidence For RNA Recombination in Nature. *Jornal Genetics Virology* 68, 2551-2561.
- Russo, M. e Martelli, G., 1981. *The fine structure of Cymbidium ringspot virus in host tissues. II. Light and electron microscopy of localized infections*. s.l.:J Ultrastruct Res 77, 105-18.
- Ryu, C., Anand, A., Kang, L. e Mysore, K., 2004. Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse Solanaceous species. *Plant J.* 40, 322–331.
- Sambrook, J., Fritsch, E. e Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Sanger, H. L., 1969. Functions of the Two Particles of Tobacco. *Journal of Virology* 3(3) 304-312 .
- Senthil-Kumar, M., Hema, R., Anand, A., Kang, L., Udayakumar, M. e Mysore, K. S., 2007. A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytol.* 176, 782–791.
- Sharma, A. K. e Sharma, M. K., 2005. Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv*, v.27, n.6, Nov-Dec, p.811-32.

- Sharma, A. K. e Sharma, M. K., 2009. Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv*, v.27, n.6, Nov-Dec, p.811-32.
- Souza-Dias, J. A. C. d., 2001. Vírus “Mop Top” (Potato Mop Top Virus - PMTV) e “Rattle” (Tobacco Rattle Virus - TRV), duas viroses distintas causadoras de sintomas semelhantes nos tubérculos de batata. *Associação Brasileira de batata*, 1(3).
- Spitzer, B., Zvi, M. M., Ovadis, M., Marhevka, E., Barkai, O., Edelbaum, O., Marton, I., Masci, T., Alon, M., Morin, S., Rogachev, I., Aharoni, A. e Vainstein, A., 2007. Reverse genetics of floral scent: application of tobacco rattle virus-based gene silencing in *Petunia*. *Plant Physiol* 145, 1241–1250.
- Staden, R., Judge, D. e Bonfield, J., 2003. Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: Krawetz SA, Womble DD. Introduction to Bioinformatics. *A Theoretical and practical approach*. Human Press Inc, Totawa.
- Sudarshana, M. e Berger, P., 1998. Nucleotide sequence of both genomic RNAs of a North American tobacco rattle virus isolate. s.l.: Arch Virol 143, 1535-44.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. e Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucl. Acid. Res.* 22, 4673-4680.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., Zamore, P. D., 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306,1377-80.
- Unver, T. e Budak, H., 2009. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *Int. J. Plant Genomics* 198680.
- Van Belkum, A., Cornelissen, B., Linthorst, H., Bol, J., Pley, C. e Bosch, L., 1987. tRNA-like properties of tobacco rattle virus RNA. *Nucleic Acids Research* 15, 2837-2850.
- Van Hoof, H., 1968. Transmission of Tobacco Rattle Virus By *Trichodorus* Species. *Nematologica* 14( 1) 20-24(5).
- Wroblewski, T., Tomczak, A. e R, M., 2005. Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnol Journal* 3, 259–273.
- Yang, Shu-Jun, Carter, S. A. , Cole, A. B. , Cheng, Ning-Hui e Nelson, R. S., 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased

susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 6297–6302.

Yusibov, V., Shivprasad, S., Turpen, T. H., Dawson, W. e Koprowski, H.1999. Plant viral vectors based on tobamoviruses. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 240, 81–94.

Zhang, L. e Xing, D., 2008. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death.

## Apêndices

### 1. Análise nucleotídica dos isolados Pivo 4, Lavrinha e CAM

>Pivo4 (1875)

```

1 AAAATTTTCA GAATGTCTTC GGGGGACCCC GCTGACTTCT GGCATGTTGA
  51 GGATGGATGA CTTGAGCTTA ACTTCAACAT GTTTATCCGG TTTCTAGGCC
 101 GTTTTTCCTA GAAGTTTTAG AGTTAGATTT GTGTACATAT TTTACTTTGA
 151 AAACAAGGAA CGTGAGGTGT GGCTTGCCGA ACGCTCCGGT TAAAAACGCC
 201 CGTCTTATCG GAGCGCATGT GAAATCAACC ACGATTTCTC GGGTTC AACA
 251 AGTTTCTTGT TGTAAGCCAT CACTTTTTT GTGTAATGGA TGCATAATTA
 301 TACTGATTGT GCGATTTTAA ATATCATTAT TATAAGATTT TGCTTGCTG
 351 ATCCATGGT TGCTGCAATC ACCTGCGCAA AATGGCAATG TACGATGACG
 401 AATTCGATAC GAAAGCTTCT GACTTACCT TCTCTCCGTG GGTGAGGTT
 451 GAGAATTGGA AAGATGTTAC TACTAGTTG AGAGCGATTA AGTTCGCGTT
 501 GCAAGCTGAC AGAGACAAA TTCCCGGGT TCTTAGTGAT TTGAAAACGA
 551 ATTGTCCTTA TTCGGCCTTC AAGAGGTTTC CTGATAAAAAG TTTGTACTCA
 601 GTTCTTCCTA AGGAGGCTGT GATTGCCGTA GCTCAGATTC AAGCTGCTTC
 651 TGCTTTTAAA AGACGCGCAG ACGAGAAGAA TGCTGTTTCT GGTCTGGTTT
 701 CAGTTACGCC GACGCAAGTT TCGCAATCTG CGTCTTCTTC TGCAGCGACT
 751 CCAGTCGGCT TAGCTACTGT GAAACCGCCT CGCGAGAGTG ACAGTGCTTT
 801 TCAGGAAGAC ACTTTTTCTT ATGCTAAGTT TGATGATGCG TCCACTGCCT
 851 TCCACAAAGC TCTTGCTTAT TTGGAAGGTT TAAGTCTGAG ACCAACTTAC
 901 CGTAGGAAGT TTGAGAAGGA CATGAACGTG AAATGGGGGG GTTCTGGTTC
 951 TGTCCTCAAGT GGAGCTCCAG CGGGAGGTTT TTCCGGCTCA GCTCCTCCAA
1001 CTTCTGGAAG TTCTGGGTCC GGTGCGGCTC CCACACCTCC ACCCAATCCT
1051 TGATTTGAAT TGATTTAAGA GTTGTCTGCT TTACGGACAG GGGGAACCGC
1101 TCCATACGGT TTAGTGTGAA AAGAAGCACT CACAAA AATT CTTTTTATCT
1151 TTGTTGTGTG GTTGACGAAA AGACTGATGA GTCGTTTCGT TGCATAATTT
1201 AATTTAAGTT TTATTTGCTT AGTGGATTTT GACTTTTTT TGAATATGGA
1251 TTACAAGAAA TGGTCGACGG ACAGTACGTT GTACTTCGGT ATAAAAACGG
1301 TAGGAAGGCT TATGATTTTT CGAGTATCAG TGATTCCTCT GCGGCAGGAG
1351 GGTGTTAAC AGTTCAGCT ATCGCGGCTG CTTTGCCTTC TGTGCCTGTG
1401 CAGGCTGTTA GGCAGTCTGT GGAGAAAAGC CTTACTTCCG CAAGTGGAGG
1451 TGCTTGAGC ACTTTACAGG GTAAAAGAAGC ATCGAAGGAG AGGGAGGCTG
1501 AGTGGCAGCA GGCTGTCTTC GAAAGTCAAT ACAATCCACC GCTGCCTTAG
1551 CTTAGGTTTA GTTGTGTGAT TTTGTGCTGT CGTTGTTGTT TTAAGTGTTA
1601 TTGTGTTT CAG TAGTTTATGT TTATTTTAGT TATGTTTGT TTTACTTGTGT
1651 ATGAGCTAGG TATGGGTGTT TTCCCTGCTT AAGTGGTTCT ACCATAGGGG
1701 TAAAAACAGT GTGTTTATTT TATTATATTT TAGTGTTTAT AAAAATCCAA
1751 AAAGATTTTC GTAATTTTTA GTTTTCGGCA CTTGCCGGGG GTTGAGTAAC
1801 ATTAAGTTG ATAAGTTTAA TGCTGGCGAA CAAAGGTGA AAAACCCTTC
1851 GTCAACCGTG AACGTTATCA CGCCC

```

>Lavrinha (2042b)

```

1 AAAATTTTCA GAATGTCTTC GGGGGACCCC GCTGGCTTCT GCGGTGTTGA
  51 GGATGGATGA CTTGAGCTTA ACTTCAACAT GTTTATCCGG TTTCTAAGCC
 101 GTTTTTCTTA GAAGTTTTAG AGTTAGATTT GTGTACATAT TTTACTTTGA
 151 AAACAAGGAA CGTGAGGTGT GGCTTGCCGA ACGCTCCGGT TAAAAACGCC
 201 CGTCTTATCG GAGCGCATGT GAAATCAACC ACGATTTCTC AGGTTCAACA
 251 AGTTTCTTGT TGTAAGCCAT CACACTTTTT GTGTAATGGA TGCATAATTA
 301 TACTGATTGT GCGATTTTAA ATATCATTAT TATAAGATTT TGCCTTGCTG
 351 ATCCACTGGT TGCTGCAATC ACCTGCGCAA AATGGCAATG TACGATGACG
 401 AATTCGATAC GAAAGCTTCT GACCTTACCT TCTCTCCGTG GGTCGAGGTT
 451 GAGAATTGGA AAGATGTTAC TACTAGGTTG AGAGCGATTA AGTTCGCGTT
 501 GCAAGCTGAC AGAGACAAA TTCCCGGGGT TCTCAGTGAT TTGAAAACGA
 551 ACTGTCCTTA TTCGGCCTTC AAGAGGTTTC CTGATAAAAAG TTTGTACTCA
 601 GTTCTTCTTA AGGAGGCTGT GATGGCTGTA GCTCAGATTC AAGCTGCTTC
 651 TGCTTTTAAA AGACGCGCAG ACGAGAAGAA TGCTGTTTCT GGTCGGTGT
 701 CAGTTACGCC GACGCAAATT TCGCAATCTG CGTCTTCTTC GGCAGCGACT
 751 CCAGTCGGTT TAGCTACCGT GAAACCGCCT CGCGAGAGTG ACAGTGCTTT
 801 TCAGGAAGAC ACTTTTTCTT ATGCTAAGTT TGATGATGCG TCCACTGCCT
 851 TCCACAAAGC TCTTGCTTAT TTGGAAGGTT TAAATCTGAG ACCAACTTAC
 901 CGTAGGAAGT TTGAGAAGGA CATGAACGTG AAATGGGGGG GTTCTGGTTC
 951 TGCCCCAAGT GGAGCTCCAG CGGGAGGTTT TTCCGGCTCA GCTCCTCCAA
1001 CTTCTGGAAG TTCTGGGTCC GGTGCGGCTC CCGCACCTCC ACCTAATCCT
1051 TGATTTGAAT CGATTTAAGA GTTGTCTGCT TTACGGACAG GGGGAACCGC
1101 TCCATACGGT TTAGTGAAA AGAAGCACTT ACAAAAATTC TTTTATCTT
1151 TGTTGTGTGG TTGACGAAA GACTGATGAG TCGTTTCGTT GCATAATTTA
1201 ATTTAAGTTT TATTTGCTCA GTGGATTTG ACACTTTTCT GAATATGGAT
1251 TACAAGAAAT GGTGACGGA CAGTACGTTG TACTTCGGAG ATAATTACAG
1301 ACTTTACAAT ATGAGATGAA GTTTGTAAAA GACCAAGTGA CTCCGTATGC
1351 AGCTGTCAGG TTGATGCTTG AAAGATGTGA CCCTAAAGTC GTCAAGTGTG
1401 TCAGATCAGA TGGGAAATGT ATGTTACAT TTCCTGATGG GAAAAGGAGT
1451 GTCTGGTTTA AAGCCGGTAG GAAGGCTTAT GATTTTTCGA GCATTAGTGA
1501 TTCCTCTGCG GCAGGAGGGT CGTTAACAGT TCCGGCTATC GCGGCTGCTT
1551 TGCCTTCCGT GCCTGTGCAG GCTGTTAGGC AGTCTGTGGA GAAAGCGCCT
1601 ACTTCCGCAA GTGAAGGTGC TTGGAGCACT TTACAGGGTA AAGAAGCGTC
1651 GAAGGAGAGG GAGGCTGAAT GGCAGCAGGC TGTCTTCGAA AGTCAATACA
1701 ATCCACCGCT GCCTTAACTT AGGTTTGGTT GTGCGATTTT GTGCTGTCGT
1751 TGTTGTTTTA ACTGTTATTG TGTTTAGTAG TTTATGTTTA TTTTAGTTAT
1801 GTTTGTTTTA CTTGTGTATG AGCTAGGTAT GGGTGTTTTT CCTGCTTAAG
1851 TGGTTCTACC ATAGGGGTAA AAACAGTGTG TTTATTTTAT TATATTTTAG
1901 TGTTTATAAA AATCCAAAA GATTTTCGTA ATTTTATAGT TTCGGCACTT
1951 GCCGGGGGTT GAATAACATT AAAGTCGATA AGTTTAATGC TGGCGAACAA
2001 AGGGTGAAA ACCCTTCGTC AACCGTGAAC GTTATCACGC CC

```

&gt;CAM (1799)

```

1 AAAATTTTCA GAATGTCTTC GGGGGACCCC GCTGACTTCT GCGGTGTTGA
  51 GGATGGATGA CTTGAGCTTA ACTTCAACAT GTTTATCCAG TTTCTAGGCC
 101 GTTTTTCCTA GAAGTTTTAA AATTTTCAGA ATGTCTTCGG GGGACCCCGC
 151 TGACTTCTGG CGTCTTGAGG ATGGATGACT TGAGCTTAAC TTCAACATGT
 201 TTATCCGGTT TCTAGGCCGG TTTTCCTAGA AGTTTTAGAG TTAGATTTGT
 251 ACATATTTTA CTTTGAAAAC AAGGAACGTG AGGTATGGCC TGCCGAACGC
 301 TCTGGTTAAA ATAGAGTTAG ATTTGTACAT ATTTTACTTT GAAAACAAGG
 351 AACGTGAGGT GTGGCTTGCC GAACGCTCTG GTTAAAAAAT GCCCGTCTTA
 401 TCGGAGCGCA TGTGAAATCA ACCACGATTT CTCTGGTTCA ACAAGTTTCT
 451 TGTTGTAAGC CATCACACTT TTGTGTAATG GATGCATAAT TATACTGATT
 501 GTGCGATTTT AAATATCATT ATTATAAGAT TTTGCCTTGC TGATCCACCG
 551 GTTGCTGCAA TCACCTGCGC AAAATGGCAA TGTACGACGA CGAATTTCGAT
 601 ACGAAAGCTT CTGACCTTAC CTTCTCTCCG TGGGTCGAGG TTGAGAATTG
 651 GAAAGATGTT ACTACTAGGT TGAGAGCGAT TAAGTTTCGG TTGCAAGCTG
 701 ACAGAGACAA AATTCCTGGG GTGCTTAGTG ATTTGAAAAC GAATTGTCCT
 751 TATTCGGCCT TCAAGAGGTT TCCTGATAAA AGTTTGTACT CAGTTCCTCT
 801 TAAGGAGGCT GTGATTGCCG TAGCTCAGAT TCAATCTGCT TCTGGTTTTA
 851 AAAGACGCGC AGACGAGAAG AATGCTGTTT CTGGTCTGGT TTCAGTTACG
 901 CCGACGCAA TFCGCAATC TGCGTCTTCT TCTGCAGCGA CTCCAGTCGG
 951 TTTAGCTACT GTGAAACCGC CTCGCGAGAG TGACAGTGCT TTTCAGGAAG
1001 ACACTTTTTT TTATGCTAAG TTTGATGATG CGTCCACTGC CTTCCACAAA
1051 GCTCTTGCTT ATTTGGAAGG TTTAAGTCTG AGACCAACTT ACCGTAGGAA
1101 GTTTGAGAAG GACATGAACG TGAAATGGGG GGGTCTGGT TCTGCCCAA
1151 GTGGAGCTCC AGCGGGAGGT TCTTCCGGCT CAGCTCCTCC AACTTCTGGA
1201 AGTTCTGGGT CCGGTGCGGC TCCCACACCT CCACCTAATC CTTGATTTGA
1251 ATCGATTTAA GAGTTGTCTG CTTTACGGAC AGGGGGAACC GCTCCATACG
1301 GTTTAGTGTG AAAAGAAGCA CTTACAAAAA TTCTTTTTAT CTTCTGTTGT
1351 GGCATGAAGC ATTTACAAAA GTGCAAAACC GATAATCCTT TAAAGGAGAA
1401 ACGGTTGAAC ACACCAAAAA GACTGTTTAG AGATGATGTA GATTTTGGTC
1451 TTAATTTACT GTTTAGTGAG GTGTGTTGAT AGTAGTTAGT TAAATGTTTA
1501 ATTAATGTGC TATTTTAGTT AACGTTATAA TATTTAGTAG TATAGTGTTA
1551 TGTTATTATG TTTGTTTTAT TTGTGTATGA GCTAGGTATG GGTGTATGCC
1601 CTGCTTAAGT GGTCTACCA TAGGAGTAAA AACAGTGTGT TTATTTATTA
1651 TTTTAGTGTT TATAAAAATC CAAAAAGATT TTCGTAGGTT TTAGGTTTCG
1701 GCATTTGGCC GGGGTTGAA TAACATTAAT GTGGATAAGT TTGATGCTGG
1751 CGAACAAAGG GTGAAAACCC CTTCTGCAAC CGTGAACGTT ATCACGCCC

```

## 2. Alinhamento múltiplo entre as sequências acima adquiridas

Appendix

Pivo4	-----	
Lavrinha	-----	
CAM	AAAATTTTCAGAATGTCTTCGGGGGACCCCGCTGACTTCTGGCGTGTGAGGATGGATGA	60
Pivo4	-----AA	2
Lavrinha	-----AA	2
CAM	CTTGAGCTTAACTTCAACATGTTTATCCAGTTTCTAGGCCGTTTTCTAGAAAGTTTAA	120
	***	
Pivo4	AATTTTCAGAATGTCTTCGGGGGACCCCGCTGACTTCTGGCATGTTGAGGATGGATGACT	62
Lavrinha	AATTTTCAGAATGTCTTCGGGGGACCCCGCTGGCTTCTGGCGTGTGAGGATGGATGACT	62
CAM	AATTTTCAGAATGTCTTCGGGGGACCCCGCTGACTTCTGGCGTCTTGGAGGATGGATGACT	180
	*****	
Pivo4	TGAGCTTAACTTCAACATGTTTATCCGGTTTCTAGGCCGTTTTCTAGAAAGTTTATAGAG	122
Lavrinha	TGAGCTTAACTTCAACATGTTTATCCGGTTTCTAGGCCGTTTTCTAGAAAGTTTATAGAG	122
CAM	TGAGCTTAACTTCAACATGTTTATCCGGTTTCTAGGCCGTTTTCTAGAAAGTTTATAGAG	240
	*****	
Pivo4	TTAGATTTGT-----	132
Lavrinha	TTAGATTTGT-----	132
CAM	TTAGATTTGTACATATTTTACTTTGAAAACAAGGAACGTGAGGTATGGCCTGCCGAACGC	300
	*****	
Pivo4	-----GTACATATTTTACTTTGAAAACAAGGAACGTGAGGT	168
Lavrinha	-----GTACATATTTTACTTTGAAAACAAGGAACGTGAGGT	168
CAM	TCTGGTTAAAAATAGAGTTAGATTTGTACATATTTTACTTTGAAAACAAGGAACGTGAGGT	360
	*****	
Pivo4	GTGGCTTGCCGAACGCTCCGGTTAAAAA-CGCCCGTCTTATCGGAGCGCATGTGAAATCA	227
Lavrinha	GTGGCTTGCCGAACGCTCCGGTTAAAAA-CGCCCGTCTTATCGGAGCGCATGTGAAATCA	227
CAM	GTGGCTTGCCGAACGCTCTGGTTAAAAAATGCCCGTCTTATCGGAGCGCATGTGAAATCA	420
	*****	
Pivo4	ACCACGATTTCTCGGTTCAACAAGTTTCTTGTGTGTAAGCCATCACACTTTTTGTGTAAT	287
Lavrinha	ACCACGATTTCTCGGTTCAACAAGTTTCTTGTGTGTAAGCCATCACACTTTTTGTGTAAT	287
CAM	ACCACGATTTCTCGGTTCAACAAGTTTCTTGTGTGTAAGCCATCACACTTTTT-GTGTAAT	479
	*****	
Pivo4	GGATGCATAATTATACTGATTGTGCGATTTTAAATATCATTATTATAAGATTTTGCCTTG	347
Lavrinha	GGATGCATAATTATACTGATTGTGCGATTTTAAATATCATTATTATAAGATTTTGCCTTG	347
CAM	GGATGCATAATTATACTGATTGTGCGATTTTAAATATCATTATTATAAGATTTTGCCTTG	539
	*****	
Pivo4	CTGATCCACTGGTTGCTGCAATCACCTGCGCAAAAATGGCAATGTACGATGACGAATTTCGA	407
Lavrinha	CTGATCCACTGGTTGCTGCAATCACCTGCGCAAAAATGGCAATGTACGATGACGAATTTCGA	407
CAM	CTGATCCACCGTTGCTGCAATCACCTGCGCAAAAATGGCAATGTACGACGACGAATTTCGA	599
	*****	
Pivo4	TACGAAAGCTTCTGACCTTACCTTCTCTCCGTGGGTCGAGGTTGAGAAATTGGAAAGATGT	467
Lavrinha	TACGAAAGCTTCTGACCTTACCTTCTCTCCGTGGGTCGAGGTTGAGAAATTGGAAAGATGT	467
CAM	TACGAAAGCTTCTGACCTTACCTTCTCTCCGTGGGTCGAGGTTGAGAAATTGGAAAGATGT	659
	*****	
Pivo4	TACTACTAGGTTGAGAGCGATTAAGTTTCGCGTTGCAAGCTGACAGAGACAAAATTCCC	527
Lavrinha	TACTACTAGGTTGAGAGCGATTAAGTTTCGCGTTGCAAGCTGACAGAGACAAAATTCCC	527
CAM	TACTACTAGGTTGAGAGCGATTAAGTTTCGCGTTGCAAGCTGACAGAGACAAAATTCCC	719
	*****	
Pivo4	GGTTCTTAGTGATTGAAAACGAATTGTCTTATTTCGGCCTTCAAGAGGTTTCTTGATAA	587
Lavrinha	GGTTCTTAGTGATTGAAAACGAATTGTCTTATTTCGGCCTTCAAGAGGTTTCTTGATAA	587
CAM	GGTGCTTAGTGATTGAAAACGAATTGTCTTATTTCGGCCTTCAAGAGGTTTCTTGATAA	779
	*** **	



Pivo4 AAGTTTGTACTCAGTTCTTCTCCTAAGGAGGCTGTGATTGCCGTAGCTCAGATTCAGCTGC 647  
Lavrinha AAGTTTGTACTCAGTTCTTCTCCTAAGGAGGCTGTGATGGCTGTAGCTCAGATTCAGCTGC 647  
CAM AAGTTTGTACTCAGTTCTCTCTAAGGAGGCTGTGATTGCCGTAGCTCAGATTCAGCTGC 839  
\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

Pivo4 TTCTGCTTTTAAAAGACGCGCAGACGAGAAGAATGCTGTTTCTGGTCTGGTTTCAGTTAC 707  
Lavrinha TTCTGCTTTTAAAAGACGCGCAGACGAGAAGAATGCTGTTTCTGGTCTGGTTTCAGTTAC 707  
CAM TTCTGGTTTTAAAAGACGCGCAGACGAGAAGAATGCTGTTTCTGGTCTGGTTTCAGTTAC 899  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Pivo4 GCCGACGCAAATTCGCAATCTGCGTCTTCTTCTGCAGCGACTCCAGTCGGTTTAGCTAC 767  
Lavrinha GCCGACGCAAATTCGCAATCTGCGTCTTCTTCTGCAGCGACTCCAGTCGGTTTAGCTAC 767  
CAM GCCGACGCAAATTCGCAATCTGCGTCTTCTTCTGCAGCGACTCCAGTCGGTTTAGCTAC 959  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Pivo4 TGTGAAACCGCCTCGCGAGAGTGACAGTGCTTTTTCAGGAAGACACTTTTCTTATGCTAA 827  
Lavrinha CGTGAAACCGCCTCGCGAGAGTGACAGTGCTTTTTCAGGAAGACACTTTTCTTATGCTAA 827  
CAM TGTGAAACCGCCTCGCGAGAGTGACAGTGCTTTTTCAGGAAGACACTTTTCTTATGCTAA 1019  
\*\*\*\*\*

Pivo4 GTTTGATGATGCGTCCACTGCCTTCCACAAAGCTCTTGCTTATTTGGAAGGTTTAAAGTCT 887  
Lavrinha GTTTGATGATGCGTCCACTGCCTTCCACAAAGCTCTTGCTTATTTGGAAGGTTTAAATCT 887  
CAM GTTTGATGATGCGTCCACTGCCTTCCACAAAGCTCTTGCTTATTTGGAAGGTTTAAAGTCT 1079  
\*\*\*\*\* \*\*

Pivo4 GAGACCAACTTACCGTAGGAAGTTTGAAGGACATGAACGTGAAATGGGGGGTTCTGG 947  
Lavrinha GAGACCAACTTACCGTAGGAAGTTTGAAGGACATGAACGTGAAATGGGGGGTTCTGG 947  
CAM GAGACCAACTTACCGTAGGAAGTTTGAAGGACATGAACGTGAAATGGGGGGTTCTGG 1139  
\*\*\*\*\*

Pivo4 TTCTGTCCCAAGTGGAGCTCCAGCGGGAGGTTCTTCCGGCTCAGCTCCTCCAACCTCTGG 1007  
Lavrinha TTCTGCCCCAAGTGGAGCTCCAGCGGGAGGTTCTTCCGGCTCAGCTCCTCCAACCTCTGG 1007  
CAM TTCTGCCCCAAGTGGAGCTCCAGCGGGAGGTTCTTCCGGCTCAGCTCCTCCAACCTCTGG 1199  
\*\*\*\*\*

Pivo4 AAGTTCTGGGTCCGGTGC GGCTCCACACCTCCACCCAATCCTTGATTGAATTGATTTA 1067  
Lavrinha AAGTTCTGGGTCCGGTGC GGCTCCCGCACCTCCACCTAATCCTTGATTGAATCGATTTA 1067  
CAM AAGTTCTGGGTCCGGTGC GGCTCCACACCTCCACCTAATCCTTGATTGAATCGATTTA 1259  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Pivo4 AGAGTTGTCTGCTTTACGGACAGGGGAACCGCTCCATACGGTTTAGTGAAAAGAAGC 1127  
Lavrinha AGAGTTGTCTGCTTTACGGACAGGGGAACCGCTCCATACGGTTTAGTG-GAAAAGAAGC 1126  
CAM AGAGTTGTCTGCTTTACGGACAGGGGAACCGCTCCATACGGTTTAGTGAAAAGAAGC 1319  
\*\*\*\*\*

Pivo4 ACTCACAAAAATCTTTTATCTT-TGTTGTGTGGTTGACGAAAAGACTGATGAGTCGTT 1186  
Lavrinha ACTTACAAAAATCTTTTATCTT-TGTTGTGTGGTTGACGAAAAGACTGATGAGTCGTT 1185  
CAM ACTTACAAAAATCTTTTATCTTCTGTTGTG----- 1351  
\*\*\* \*\*\*\*\*

Pivo4 TCGTTGCATAATTTAATTTAAGTTTATTTGCTTAGTGGATTTTGACACTTTTCTGAATA 1246  
Lavrinha TCGTTGCATAATTTAATTTAAGTTTATTTGCTCAGTGGATTTTGACACTTTTCTGAATA 1245  
CAM -----GCATGA-----AGCA 1361  
\*\*\*\* \* \*\*

Pivo4 TGGATTACAAGAAATGGTTCGACGGACAGTACGTTGTACTTCGG----- 1289  
Lavrinha TGGATTACAAGAAATGGTTCGACGGACAGTACGTTGTACTTCGGAGATAATTACAGACTTT 1305  
CAM T---TTACAAAAG----- 1371  
\*\*\*\*\* \*

Pivo4 -----TATAAAAA----- 1297  
Lavrinha ACAATATGAGATGAAGTTTGTAAAAGACCAAGTACTCCGTATGCAGCTGTCAGGTTGAT 1365  
CAM -----TGCAAAA----- 1378  
\*\*\*\*\*

Pivo4 ----- 1425  
Lavrinha GCTTGAAAGATGTGACCCTAAAGTCGTCAGTGTGTCAGATCAGATGGGAAATGTATGTT 1425  
CAM -----

```

Pivo4          -----CGGTAGGAAGGCTTATGATTT 1318
Lavrinha      CACATTTCTGATGGGAAAAGGAGTGTCTGGTTTAAAGCCGGTAGGAAGGCTTATGATTT 1485
CAM           -----CCGATAATCC 1388
                                     *** **

Pivo4          TTCGAGTATCAGTGATTCTCTGCGGCAGGAGGGTCGTTAACAGTTCAGCTATCGCGGC 1378
Lavrinha      TTCGAGCATTAGTGATTCTCTGCGGCAGGAGGGTCGTTAACAGTTCAGCTATCGCGGC 1545
CAM           TTTAA-----AGGAGA-----AACGGTTG-----AACACA-- 1413
***          *****          *** **          * * *

Pivo4          TGCTTTGCCTTCTGTGCCTGTGCAGGCTGTTAGGCAGTCTGTGGAGAAAGCGCCTACTTC 1438
Lavrinha      TGCTTTGCCTTCCGTGCCTGTGCAGGCTGTTAGGCAGTCTGTGGAGAAAGCGCCTACTTC 1605
CAM           -----CCAAAAAGACTGTT-----TAGAGATGATGTAGATTTT 1446
                                     *   ** *****          * ***** * **

Pivo4          CGCAAGTGGAGGTGCTTGGAGCACTTTACAGGGTAAAGAAGCATCGAAGGAGAGGGAGGC 1498
Lavrinha      CGCAAGTGAAGGTGCTTGGAGCACTTTACAGGGTAAAGAAGCGTCGAAGGAGAGGGAGGC 1665
CAM           -----GGT-CTT-----AATTTACTGTTTGTAGGAGGTGT-----GT 1476
                                     *** **          * ***** ** * * *          *

Pivo4          TGAGTGGCAGCAGGCTGTCTTCGAAAGTCAATACAATCCACCGCTGCCTTAGCTTAGGTT 1558
Lavrinha      TGAATGGCAGCAGGCTGTCTTCGAAAGTCAATACAATCCACCGCTGCCTTAGCTTAGGTT 1725
CAM           TGA---TAGTAG-----TT---AGTTAA-----ATGTT 1498
***          ** **          ***** **          * *****

Pivo4          TAGTTGTGTGATTTTGTGCTGTCGTTGTTGTTTTAACTGTTATTGTGTTTTCAGTAGTTTAT 1618
Lavrinha      TGTTGTGCGATTTTCGTGCTGTCGTTGTTGTTTTAACTGTTATTGTGTTTTCAGTAGTTTAT 1785
CAM           TAATTA---AT---GTGCTATTTTAG-----TTAAC-GTTATAATATTTAGTAGTATAG 1545
***          **          ***** * * *          ***** ***** * ** ***** **

Pivo4          GTTTATTTTAGTTATGTTTGTGTTTACTTGTGTATGAGCTAGGTATGGGTGTTTTCCCTGC 1678
Lavrinha      GTTTATTTTAGTTATGTTTGTGTTTACTTGTGTATGAGCTAGGTATGGGTGTTTTCCCTGC 1845
CAM           TGTTATGTTA-TTATGTTTGTGTTTATTTGTGTATGAGCTAGGTATGGGTGTTTCCCTGC 1604
***          *** ***** ***** ***** ***** * *****

Pivo4          TTAAGTGGTTCACCATAGGGGTAAAAACAGTGTGTTTATTTTATTATATTTTAGTGTTT 1738
Lavrinha      TTAAGTGGTTCACCATAGGGGTAAAAACAGTGTGTTTATTTTATTATATTTTAGTGTTT 1905
CAM           TTAAGTGGTTCACCATAGGAGTAAAAACAGTGTGTTTATTTATTATTTTAGTGTTT 1661
***** ***** ***** ***** ***** *****

Pivo4          ATAAAAATCCAAAAAGATTTTCGTAATTTTGTGTTTTCGGCACTTG-CCGGGGGTTGAGT 1797
Lavrinha      ATAAAAATCCAAAAAGATTTTCGTAATTTTGTGTTTTCGGCACTTG-CCGGGGGTTGAGT 1964
CAM           ATAAAAATCCAAAAAGATTTTCGTAATTTTGTGTTTTCGGCACTTG-CCGGGGGTTGAGT 1721
***** ***** ***** ***** ***** * * *

Pivo4          AACATTAAGTGGATAAGTTTAAATGCTGGCGAACAAAGGGTGAAAAACCCCTTCGTCAACC 1857
Lavrinha      AACATTAAGTGGATAAGTTTAAATGCTGGCGAACAAAGGGTGAAAAACCCCTTCGTCAACC 2024
CAM           AACATTAAGTGGATAAGTTTAAATGCTGGCGAACAAAGGGTGAAAAACCCCTTCGTCAACC 1781
***** ***** ***** ***** ***** *****

Pivo4          GTGAACGTTATCACGCC--- 1875
Lavrinha      GTGAACGTTATCACGCC--- 2042
CAM           GTGAACGTTATCACGCC--- 1799
*****

```

### 3.Análise de constituição de aminoácidos

>CAM-CP (223aa)

MAMYDDEFDTKASDLTFSPWVEVENWKDVTTTLRAIKFALQADRDKIPGV 50  
 LSDLKTNCYPYSAFKRFPDKSLYSVLSKEAVIAVAQIQSASGFKRRADEKN 100  
 AVSGLVSVTPTQISQSASSAATPVGLATVKPPRESDSAFQEDTFSYAKF 150  
 DDASTAFHKALAYLEGLSLRPTYRRKFEKDMNVKWGGSGSAPSGAPAGGS 200  
 SGSAPPTS GSSSGGAAPT P P P P N P

>Lavrinha-CP

MAMYDDEFDTKASDLTFSPWVEVENWKDVTTTLRAIKFALQADRDKIPGV 50  
 LSDLKTNCYPYSAFKRFPDKSLYSVLPKEAVMAVAQIQAASAFKRRADEKN 100  
 AVSGLVSVTPTQISQSASSAATPVGLATVKPPRESDSAFQEDTFSYAKF 150  
 DDASTAFHKALAYLEGLNLRPTYRRKFEKDMNVKWGGSGSAPSGAPAGGS 200  
 SGSAPPTS GSSSGGAAP P P P P N P

>Pivo4-CP

MAMYDDEFDTKASDLTFSPWVEVENWKDVTTTLRAIKFALQADRDKIPGV 50  
 LSDLKTNCYPYSAFKRFPDKSLYSVLPKEAVIAVAQIQAASAFKRRADEKN 100  
 AVSGLVSVTPTQVQSASSAATPVGLATVKPPRESDSAFQEDTFSYAKF 150  
 DDASTAFHKALAYLEGLSLRPTYRRKFEKDMNVKWGGSGSVPSGAPAGGS 200  
 SGSAPPTS GSSSGGAAPT P P P P N P