

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Apple stem grooving virus* E CONSTRUÇÃO DE UM CLONE INFECCIOSO

Elen Bonilha de Souza

Pelotas, 26 de fevereiro de 2016

Elen Bonilha de Souza

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Apple stem grooving virus* E CONSTRUÇÃO DE UM CLONE INFECCIOSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia)

Orientador: Prof^a. Dra. Danielle Ribeiro de Barros

Coorientadores: Dr. Osmar Nickel e Dr. Cesar Bauer Gomes

Pelotas, 2016

Banca examinadora:

Fábio Nascimento da Silva, Dr.

Ismail Teodoro de Souza Junior, Dr.

Leandro José Dallagnol, Dr.

Osmar Nickel, Dr.

Danielle Ribeiro de Barros, Dra.
(Orientadora)

*Ao Doutor Osmar Nickel,
por seu trabalho dedicado à virologia vegetal, ofereço.*

Primeiramente agradeço a Dra. Danielle Ribeiro de Barros, pela confiança depositada, pela orientação, pelos ensinamentos, apoio, pela amizade, desde o primeiro dia e ao longo desses seis anos de convívio. Por quem sempre guardarei carinho e respeito de uma eterna orientadora.

Ao meu coorientador, Dr. Cesar Bauer Gomes, pela orientação, pelos conselhos e pelo apoio, especialmente no momento da minha qualificação.

Ao meu coorientador, Dr. Osmar Nickel, grande idealizador desse projeto, quem permitiu a expansão da minha jornada. Agradeço imensamente por todos preciosos conselhos e ensinamentos.

Ao meu orientador estrangeiro Dr. Jelkmann, que me recebeu no Julius Kühn Institut, e me fez parte do seu grupo de pesquisa, compartilhando sua experiência e conhecimento.

A Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, em especial, ao Programa de Pós Graduação em Fitossanidade (PPGFS), extensivo a todos os professores e funcionários.

A secretária do PPGFS, Neide Quevedo, por gentilmente auxiliar nas questões burocráticas e financeiras;

Ao funcionário Serginho, sempre disponível, colaborando para o bom funcionamento da estrutura e funcionamento dos laboratórios, sempre de maneira gentil e prestativa;

A Embrapa Uva e Vinho, Instituição que me acolheu em um seu ambiente de construção, possibilitando ao meu crescimento profissional. Em especial no Laboratório de Virologia Vegetal, ao técnico de laboratório Marcos Vanni, e as estagiarias Flavia Zanin de Villa e Elisandra Cunha e ao técnico de campo Heitor que se comprometeu em todas as atividades referente a caracterização biológica desse projeto.

Ao Dr. Thor Vinicius Fajardo que se disponibilizou como um coorientador, contribuindo enormemente para a execução deste projeto.

Dr. Francisco Aragão que intermediou todo o processo de sequenciamento dos genomas.

Aos componentes da minha banca de qualificação, que aqui ainda não foram citados, Dra. Bianca Obes Corrêa, Dr. Fábio Nascimento da Silva e Dr. Leandro José Dallagnol cujo os questionamentos e ideias contribuíram para o melhor desenvolvimento do projeto e da minha vida profissional.

Ao grupo de virologia Vegetal do Julius Kuhn Institut, Dr. Vladimir Jakovljevic, Constanze Berwarth, Tobias Schneider e Lei Zhang, pelos ensinamentos e amizade.

A Karoline dos Anjos, literalmente “o anjo” que tornou muito mais doce a minha incrível e difícil experiência de viver em outro país.

A Capes por ter concedido as bolsas de estudos, no Brasil e no exterior, permitindo minha dedicação a esse trabalho.

A todos os colegas do PPGFS, que dividiram comigo todos os momentos (difíceis, de descontração, de apuro) vivenciados ao longo do curso;

A Monique Nascimento, pela amizade e colaboração no ambiente de trabalho e fora dele.

A ~~A~~ colega e grande amiga Priscila Rossatto, por estar ao meu lado e segurar minha mão em todos os momentos da minha pós graduação, pelo auxílio, apoio, amor e carinho;

A minha amada família e amigos que dela fazem parte, por todo suporte, amor e carinho.

E por fim, meu mais profundo e especial agradecimento aos meus pais, presencialmente hoje representados por meu pai, Airton Souza, meu maior exemplo de vida, a pessoa que sempre esteve e está incondicionalmente ao meu lado.

A todos meu carinhoso, sincero e eterno, MUITO OBRIGADA! Vielen Dank!

SOUZA, Elen Bonilha. **CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Apple stem grooving virus* E CONSTRUÇÃO DE UM CLONE INFECCIOSO**. 2016. 67f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

O *Apple stem grooving virus* (ASGV), espécie tipo do gênero *Capillovirus*, é conhecido como um vírus latente causador do acanelamento do lenho da macieira, devido ao principal sintoma observado em espécies suscetíveis, infecção podendo levar à perda de qualidade de frutos e queda na produtividade. O vírus já foi diagnosticado em diversas partes do mundo e atualmente, existem depositados no GenBank, dezoito sequências de genomas completos de isolados de ASGV, e várias sequências parciais principalmente da região da capa proteica. O presente trabalho está dividido em dois capítulos. O capítulo I teve como objetivo a caracterização biológica e molecular de dois isolados de ASGV (M219-3 e M220), e de forma mais específica, a clonagem e sequenciamento do genoma completo dos mesmos e a análise filogenética em comparação com demais sequências disponíveis. Os fragmentos foram amplificados por RT-PCR, clonados, sequenciados e analisados com os programas Clustal W e Lasergene. O capítulo II teve como objetivo a construção de um clone infeccioso, a partir do isolado M220, utilizando-se a técnica Gibson Assembly. Ambos isolados apresentaram-se de forma similar quanto a expressão de sintomas morfológicos. Os resultados obtidos permitiram a obtenção das primeiras sequências genômicas completas de isolados brasileiros de ASGV, bem como a construção de um clone infeccioso. A identidade entre M219-3 e M220 foi de 92.2%, quando comparada a sequência de nucleotídeos, e 95.3% e 93.3%, quando comparadas as sequências de aminoácidos da proteína de movimento e capsídeo, respectivamente. A análise filogenética da proteína de movimento dos isolados com as sequências depositadas determinou dois grupos distintos quanto ao hospedeiro. M219-3 e M220 agruparam-se juntamente com isolados cujo os hospedeiros eram predominantemente maçã e pera. Dada a relevância da infecção causada por esse vírus, o trabalho contribuirá para estudos da variabilidade genética dessa espécie viral, bem como para a elucidação da associação do ASGV com a patologia já relatada na literatura.

Palavras-chave: *Malus domestica*, ASGV-sequenciamento, *Capillovirus Betaflexiviridae*, Gibson Assembly, cDNA.

SOUZA, Elen Bonilha. **BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS ISOLATES OF *Apple stem grooving virus* AND CONSTRUCTION AN INFECTIOUS CLONE.** 2016. 67p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Apple stem grooving virus (ASGV), type-specie of the genus *Capillovirus*, usually causing a latent infection in most commercial cultivars, in susceptible species plants grafted with infected material could display reduction in yield and fruit quality loss. ASGV is disseminated worldwide and currently eighteen sequences of complete genomes of isolates ASGV were available in GenBank, and several partial sequences mostly from the coat protein region. Here we report biological and molecular characterization of two isolates of ASGV (M219-3 and M220) with emphasis in cloning, sequence of both complete genome and phylogenetic analysis in comparison with other sequences available (Chapter I), by RT-PCR, cloned, sequenced and analyzed using Clustal W and Lasergene software. We also report from M220 isolate the construction an infectious clone by Gibson Assembly technique (Chapter II). The results allowed to obtain the first complete genome sequences of Brazilian ASGV isolates, and the construction of an infectious clone. The identity between M219-3 and M220 was 92.2% when compared to the nucleotide sequence and 95.3% and 93.3%, when compared to the amino acid sequences of movement protein and capsid, respectively. Phylogenetic analysis of the movement of protein isolates with available sequences displayed two different groups as the host. M219-3 and M220 were clustered whose hosts were predominantly apple and pear. This work contributes to studies of the genetic variability of this viral species, as well as the elucidation of the ASGV association with the disease previously reported in the literature.

Key-words: *Malus domestica*, ASGV complete sequence, *Capillovirus Betaflexiviridae*, Gibson Assembly, cDNA.

Lista de Figuras

Figura 1. Sintomas típicos de ASGV na cv. Fuji sobre porta enxerto Maruba	19
Figura 2. Representação esquemática da organização genômica do ASGV.....	20
Figura 3. Representação esquemática resumida das etapas descritas nos materiais e métodos referentes à coleta, manutenção e clonagem dos isolados M219-3 e M220.....	27
Figura 4. Estratégia utilizada para sequenciamento do genoma completo dos isolados M219-3 (a) e M220 (b).....	30
Figura 5. Árvore filogenética derivada das sequências de aminoácidos da ORF2 (MP) entre M219-3, M220 e demais isolados.....	36
Figura 6. Representação esquemática resumida das etapas descritas nos materiais e métodos referentes à síntese de clone infeccioso de ASGV.....	42
Figura 7. Mapa do vetor binário pv297.....	45
Figura 8 . Estratégia de amplificação e clonagem do clone infeccioso de ASGV (isolado M220), pelo método Gibson, representando os oligonucleotídeos usados para obtenção do clone de genoma completo e o vetor pv297.....	46
Figura 9. RT-PCR de herbáceas transformadas via infiltração a vácuo.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Produção de maçã em toneladas, referente ao ano de 2015, no Brasil.....	17
Tabela 2. Isolados de ASGV depositados no Genbank.....	26
Tabela 3. Tabela 3: Lista de pares de oligonucleotídeos, utilizados para sequenciamento do genoma completo dos isolados M219-3 e M220, respectivas temperaturas usados para pareamento (Tm).....	30
Tabela 4. Resultados da RT-PCR e enxertia de indicadores com os isolados M219-3 e M220.....	34
Tabela 5. Comparação das sequências de nucleotídeos dos isolados M219-3 e M220 com as sequências disponíveis no GenBank (genoma completo).....	35

Lista de abreviaturas e siglas

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
35S	35S Promotor de CaMV
A	Adenina
aa	Aminoácido
Amp	Ampicilina
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
ASGV	<i>Apple stem grooving virus</i>
ASPV	<i>Apple stem pitting virus</i>
bp	Pares de base ("base pairs")
C	Citosina
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	DNA complementar ("complementary DNA")
CP	capsídeo ("coat protein")
CPEC	Circular Polymerase Extension Cloning
CTLV	<i>Citrus tatter leaf virus</i>
cv	cultivar
CVA	<i>Cherry virus A</i>
dATP	(desoxiAdenosina Trifosfatada)
dCTP	(desoxiCitidina Trifosfatada)
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dGTP	(desoxiGuanosina Trifosfatada)

DMSO Dimetilsulfóxido
DNA Desoxiribonucleotideo
DNase Desoxiribonuclease
dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT 1,4-Dithiothreitol
dTTP (desoxiTimidina Trifosfatada)
E. coli Escherichia coli
ELISA Enzyme linked Immunosorbend Assay
FAOSTAT Food and agriculture organization of the united nations/ statistic
F-cDNA Full length complementary DNA clone
g Grama
IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses
IPTG Isopropyl- α -D-thio-galactopyranosid
Kan Canamicina
Kb Quilobase
kDa QuiloDalton
l Litro
LB Luria Bertani
M Molar
MES 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid
mg Miligrama
min Minuto
ml Millilitro
MMLV Moloney Murine Leukemia Virus
mM Millimolar
NCBI National Center for Biotechnology Information
nm Nanometro
nt Nucleotídeo
NTP – binding site nucleoside triphosphate
NTR Non translated region
ORF Open reading frame
PCR Polymerase Chain Reaction
pH Potencial hidrogeniônico

p/v Peso por volume

qPCR Real time PCR

Rif Rifampicina

RNA Ácido ribonucleico

rpm Umdrehungen pro Minute/~~r~~rotações por minuto

RT Reverse Transcriptase

sgRNA RNA subgenômico

SOC Super optimal broth

sp espécie

ssRNA RNA de fita simples

T Timina

T7 BacteriófagoT7

▲Taq *Thermus aquaticus*

T- DNA transfer DNA/DNA de transferência

▲TE —Tris-EDTA TEMED ?

▲Ti – plasmídeo indutor de tumor/~~id~~ *tumour inducing plasmid*

T_m Melting temperature/Temperatura de fusão

U Uracil

V Volume

YEB Yeast Extract Bacto

X- Gal 5-Brome-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Formatado: Cor da fonte: Vermelho

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil),

Formatado: Português (Brasil)

Sumário

1	Introdução Geral	16
2	CAPITULO I – CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Apple stem grooving virus</i> COLETADOS EM MAÇÃ NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	24
2.1	Introdução	24
2.2	Material e Métodos	27
2.2.1	Local de desenvolvimento do trabalho	27
2.2.2	Identificação e manutenção dos isolados virais.....	27
2.2.3	Caracterização biológica	28
2.2.4	Extração de RNA total	28
2.2.5	Reação de transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia - RT-PCR.....	28
2.2.6	Clonagem e sequenciamento do genoma do isolado ASGV	31
2.2.7	Análise das sequências virais.....	31
2.3	Resultados e discussão	31
2.3.1	Caracterização biológica	31
2.3.2	Caracterização molecular	35
2.4	Conclusões	37
3	CAPITULO II – CONSTRUÇÃO DE UM CLONE INFECCIOSO A PARTIR DO ISOLADO M220 DE <i>Apple stem grooving virus</i>.....	38
3.1	Introdução	38
3.2	Material e Métodos	42
3.2.1	Local de desenvolvimento do trabalho	42

	15
3.2.2	Identificação e manutenção do isolado viral 42
3.2.3	Extração de RNA total 43
3.2.4	RT-FL-PCR e RT-PCR 43
3.2.5	Preparação do Vetor binário 43
3.2.6	Clonagem e transformação de <i>Escherichia coli</i> 46
3.2.7	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATHV) 47
3.2.8	Transformação de plantas (agroinfiltração) 47
3.3	Resultados e discussão 48
3.4	Conclusões 49
4	Considerações gerais 50
5	5 Referências 51
6	Anexos..... 58

1 Introdução Geral

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma espécie lenhosa, decídua, de clima temperado, pertencente à família *Rosaceae*, subfamília *Pomoidae*, caracterizada por um fruto tipo pomo (LUCHI, 2006). Tem como provável centro de origem a região entre o Cáucaso e o leste da China e acredita-se que o início do desenvolvimento das espécies atuais ocorreu após o final da última era glacial há 20 mil anos. Os povos euro asiáticos provavelmente foram os colaboradores para a disseminação das formas primitivas das macieiras atuais (BLEICHER, 2006).

Embora haja relatos do cultivo de maçã desde 1903 no Brasil (...citação), pode-se dizer que o cultivo comercial iniciou-se na década de 1970, impulsionado pelo pioneirismo de alguns produtores e apoio decisivo do governo no Estado de Santa Catarina (BONETI et al., 2006). Cabe destacar nesse contexto a criação e execução do Profit (Projeto de Fruticultura de Clima Temperado) e a lei dos incentivos fiscais (Nº 5061), que contribuíram para a implantação do primeiro pomar comercial de maçã e deram grande incentivo inicial para o desenvolvimento da cultura no país (PETRI et al., 2011).

No Brasil a produção da maçã está concentrada na região Sul, responsável por aproximadamente 99% da produção nacional (tab. 1) (IBGE, 2014). Visando vantagens comparativas, como alta produtividade e qualidade, e estrutura de comercialização, as regiões produtoras preferenciais estão localizadas na região da serra catarinense, sendo São Joaquim, devido às condições de clima e estrutura produtiva (pequenos fruticultores), considerado o município polo. Ainda no Estado de Santa Catarina, destaca-se o meio oeste, com município polo em Fraiburgo, caracterizado por grandes empresas

(BONETI et al., 2006). Na região serrana do Estado do Rio Grande do Sul, destaca-se o município polo de Vacaria, onde predomina grandes empresas produtoras e comercializadoras, enquanto que no Paraná, observa-se a região de Palmas como quarto polo produtivo do Brasil (BONETI et al., 2006).

Tabela 1. Produção de maçã em toneladas, em 2015, no Brasil

	Produção (toneladas)
Brasil	1.339.771
Santa Catarina	659.756
Rio Grande do Sul	620.841
Paraná	50.975

Fonte: IBGE 2015

O principal produtor mundial é a China (37.000.000 t), seguida pelos Estados Unidos da América (4.110.046t), Turquia (2.889.000t), Polônia (2.887.336t) e Índia (2.203.400t). Na América do Sul destacam-se o Chile (1.625.000t), Brasil (1.335.478t) e Argentina (1.250.000t) (FAOSTAT, 2014).

A cultura da maçã enfrenta o desafio de conviver com problemas ocasionados por fatores bióticos. Fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e viroides são os principais patógenos que afetam a cultura (KUMAR et al., 2011). Ao longo dos anos, com o advento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis, tem-se verificado um aumento de plantas infectadas por um ou mais vírus, conseqüentemente, evidenciando a queda na qualidade e produção de frutos (ZHAO et al., 2012).

Atualmente são conhecidas diversas espécies de vírus em macieiras destacando-se *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple stem grooving virus* (ASGV) e *Apple mosaic virus* (ApMV), consideradas as mais importantes e melhor caracterizadas (KUMAR et al., 2011; DAR; 2013). O ApMV (família *Bromoviridae*; gênero *Ilarvirus*), é conhecido por causar sintomas aparentes, enquanto as espécies ACLSV, ASPV e ASGV (família *Betaflexiviridae*), causam infecções latentes na maioria das cultivares comerciais, geralmente ~~não causando sintomas visíveis~~ [em infecções latentes](#) (NEMETH et al., 1986; LIU et al., 2013).

Os flexivírus estão divididos em quatro famílias: *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae* e *Tymoviridae* (ADAMS et al., 2012). Possuem em comum o mesmo tipo e organização de genoma, morfologia de partícula, e um forte relacionamento filogenético entre as proteínas envolvidas na replicação e proteínas estruturais (MARTELLI et al., 2007; HIRATA et al., 2010). A Família *Betaflexiviridae* é dividida em sete gêneros: *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus*, *Tepovirus*, nove espécies que não foram inseridas em nenhum destes gêneros (ADAMS et al., 2012), e inclui espécies que infectam plantas anuais e perenes, mono e dicotiledôneas (CHAVAN et al., 2013).

O gênero *Capillovirus* possui duas espécies reconhecidas: ASGV (YOSHIKAWA et al.; 1992) e *Cherry virus A* (CVA) (JELKMANN; 1995). O ASGV é a espécie-tipo do gênero e apesar de ter sido descrita inicialmente infectando plantas de maçã (JONES; ALDWINCKLE, 1990; MAGOME et al., 1997; NICKEL et al., 1999), já foi relatada também em pera (*Pyrus sp.*) (YOSHIKAWA et al., 1996; ZHONG-BIN et al., 2010) , damasco (*Prunus armeniaca*) (NEMETH, 1986; TAKAHASHI et al., 1990), cereja (*Prunus avium L.*) (KINARD et al., 1996), quivi (*Actinidia spp.*) (CLOVER et al., 2003), citrus (*Citrus spp.*) (HERRON; SKARIA, 2000; LOVISOLO et al., 2003; MAGOME et al., 1997), normalmente ~~nomeado de~~ denominado *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), lírio (*Lilium spp.*) (INOUYE et al., 1979) e, mais recentemente, em bambu (*Nandina domestica*) (TANG et al., 2010).

O ASGV frequentemente causa infecção latente, no entanto, em plantas suscetíveis está associado a sintomas como necrose na união da enxertia e do floema, acanelamento do lenho, declínio das plantas e cancrios associados a morte de plantas em viveiros (NICKEL et al., 1999; 2001; MARTELLI et al., 2007). Espécies como *Cotoneaster bullata*, *Pyronia veitchii*, *Malus micromalus* (GMAL 273.a), *Malus yunnanensis* (GMAL 2342) e *Malus tschonoskei* (GMAL 1834) são relatadas como indicadoras, apresentando principalmente sintomas foliares, como manchas cloróticas e deformação (VAN DER MEER; 1975; SIEBERT; ENGELBRECHT, 1981; HOWELL et al.; 1996)



Figura 1. Sintomas típicos de *Apple stem grooving virus* em cv. Fuji sobre porta enxerto Maruba com visível declínio (Foto: Osmar Nickel, 2014).

ASGV tem partícula filamentosa-flexuosa de aproximadamente 600-700nm x 12nm. Possui genoma de RNA fita simples e sentido positivo, capeado na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3', monopartido e com aproximadamente 6.5 kb nucleotídeos, excluindo a cauda poliadenilada. O RNA consiste de duas ORFs (*Open Reading Frame*; Fase aberta de leitura) sobrepostas, chamadas de ORF1 e ORF2 (YOSHIKAWA et al., 1993), com pesos moleculares de 241 kDa e 36kDa, respectivamente. A ORF1 codifica uma poliproteína contendo duas sequências conservadas com domínios associados à replicação (metiltransferase, “papain-like protease”, “NTP-binding helicase” e RNA polimerase dependente de RNA), na extremidade N-Terminal, e na porção C-terminal, domínios característicos da proteína do capsídeo (CP) com peso molecular de 27kDa (YOSHIKAWA et al., 1992; OHIRA et al., 1995). A ORF2 possui domínios conservados de proteínas de movimento e a sequência consenso Gly-Asp-Ser-Gly, característica de proteases virais (MARTELLI et al., 2007; HIRATA et al., 2003; YOSHIKAWA et al., 1992), e está contida na ORF1, em outra fase de leitura (MAGOME et al., 1997). A presença da replicase e CP na mesma ORF é algo pouco comum e no grupo dos flexivírus somente os capilovírus (ASGV e CVA) têm essa característica (HIRATA et al., 2010; MARTELLI et al., 2007). Em isolados de ASGV de diferentes espécies de plantas, observa-se que a região de sobreposição, da porção correspondente a CP e MP, das ORFs 1 e 2, é significativamente

diferente, sendo denominada “região variável”. Esta região, não apresenta domínios funcionais comuns aos vírus, e não possui códons de terminação, sugerindo que a mesma seja importante para o processo de infecção do ASGV (HIRATA et al., 2010; MAGOME et al., 1999) (Fig. 2).

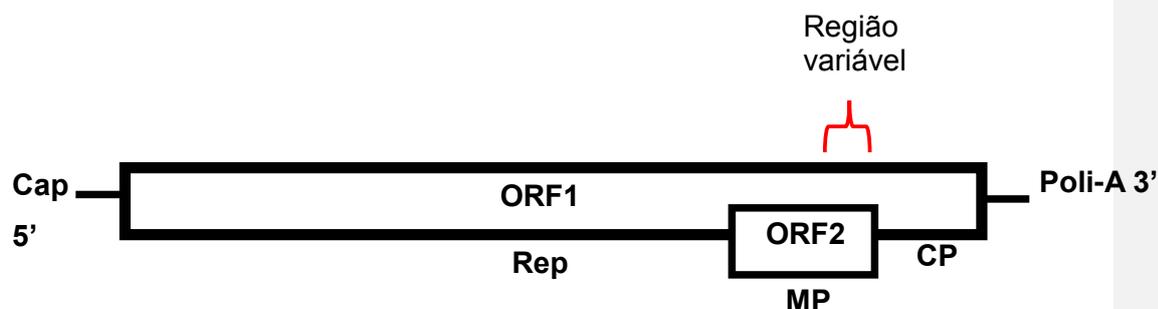


Figura 2. Representação esquemática da organização genômica de *Apple stem grooving virus*. Adaptado de (HIRATA et al., 2010)

Os vírus de RNA fita simples, sentido positivo utilizam diferentes estratégias para a expressão de seu genoma como, autoproteólise, transcrição de RNAs subgenômicos (sgRNA), reinício de tradução, vazamento de códon e genomas multipartidos e podem, ainda, usar mais de uma estratégia para atingir esse objetivo (MARTELLI et al., 2007). A exceção dentro dos flexivírus, os *Capillovirus* possuem na mesma ORF (1) a replicase (REP) e CP (YOSHIKAWA et al., 1992; TATINENI et al., 2009; MARTELLI et al., 2007). Até o momento, a estratégia de expressão do genoma dos capilovírus não foi totalmente elucidada, mas alguns pontos foram esclarecidos. A partir de preparações de RNA total, de tecidos de *Citrus* e feijão (*Phaseolus vulgaris* cv. Light Red Kidney), infectados com uma estirpe de ASGV (*Citrus tatter leaf virus*-CTLV), foi observado, além do RNA genômico viral, dois sgRNAs 3'-terminal (TATINENI et al., 2009). Este resultado sugere, que as proteínas CP e MP deste isolado de ASGV e, provavelmente dos capilovírus, estejam sendo expressas através da transcrição de sgRNAs. Em outra abordagem, uma análise mutacional foi realizada, na qual foram construídos mutantes com a inserção de códons de terminação na região variável. Observou-se que os mutantes provocaram uma diminuição na patogenicidade, mas a infecção

sistêmica foi mantida, ratificando que a CP é codificada a partir de um sgRNA (HIRATA et al., 2003; HIRATA et al 2010, TATINENI et al., 2009).

O ASGV causa ou está envolvido em declínio, necrose do floema e caneluras no xilema em alguns genótipos de porta-enxertos Maruba-kaido (*Malus prunifolia* cv. Ringo) e Mitsuba-kaido (*Malus sieboldii* cv. Rehder). A associação recorrente dessa espécie ao ACLSV dificulta a identificação do ASGV como agente etiológico do declínio do porta-enxerto Maruba no Brasil. Embora a análise de alguns tecidos doentes repetidamente não tenha revelado a presença de ACLSV, esse argumento por si só não é convincente e excludente da presença de outra espécie viral, além do ASGV, nos tecidos analisados (Nickel, comunicação pessoal).

A detecção de vírus latentes pode consistir na utilização de métodos biológicos, sorológicos e/ou moleculares (KINARD et al., 1996).

A detecção biológica pode ser realizada pela transmissão mecânica de extrato de planta infectada. Diversas plantas herbáceas já foram relacionadas como indicadoras de ASGV, tais como: *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana glutinosa*, *Phaseolus vulgaris* cultivares Pinto ealsa (JAMES, 2008), *Cucurbita* sp. (GILMER et al., 1972), *Vigna radiata*, e *Amaranthus tricolor* (SAWAMURA; OSADA, 1980), *Chenopodium amaranthicolor*, *Nicotiana occidentalis* 37B, *Cucumis sativus* (NICKEL, 2004). Plantas lenhosas também foram relatadas para o diagnóstico de ASGV. As mais usadas são *M. domestica* cv. Virginia Crab, *Malus yunnanensis* e *Malus micromalus* (GMAL 273a) (HOWELL et al.; 1996; NICKEL; FAJARDO 2009). Apesar de execução simples, o diagnóstico biológico requer uma infraestrutura apropriada para manter as condições de temperatura adequadas para expressão de sintomas, experiência com a avaliação das indicadoras, e longo tempo de observação (FRIDLUND, 1970).

A detecção sorológica por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) é um método adequado especialmente quando se precisa realizar a triagem de um grande número de plantas. É uma técnica relativamente barata, simples de ser executada e confiável, mas por outro lado requer grande quantidade de antissoro para indexação de material (NICKEL et al., 2004). Além disso, algumas peculiaridades das plantas, como baixa concentração do vírus durante períodos quentes, restrição a certos tecidos, e distribuição desuniforme podem dificultar o diagnóstico por esse método (NICKEL; FAJARDO, 2009). Em

relação à eficiência para detecção de ASGV, três diferentes métodos por ELISA foram comparados, por Wu et al., 1998, PAS- ELISA (*Protein A sandwich*), e duas versões de DAS-ELISA (*Double antibody sandwich*), mostrando-se o padrão e o método modificado de DAS-ELISA eficaz para detecção do vírus.

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma poderosa ferramenta molecular para detecção de vírus em plantas. Suas variações tais como: RT (*Reverse Transcriptase*)-PCR, de amplo espectro; PDO (*polyvalent degenerate oligonucleotides*) (FOISSAC et al., 2005); IC (*immunocapture*)-RT-PCR; nested PCR, multiplex RT-PCR, PCRq (*Real Time*) (MACKAY et al.; 2002) têm sido descritas para detecção e estudo de variabilidade genética de vírus. A versatilidade da técnica é reduzida em decorrência do custo dos equipamentos e reagentes, e a necessidade de processamento do RNA viral, mas seu desenvolvimento permitiu um diagnóstico mais sensível (NICKEL, 2004), por isso é adequada para infecções em fases iniciais, quando a concentração viral ainda é baixa na planta (NICKEL; FAJARDO, 2009).

Os métodos mencionados para detecção servem também para auxiliar na análise da variabilidade genética dos vírus, que desde 1920 tem sido evidenciada nos diferentes sintomas observados por uma espécie viral, em uma mesma espécie de plantas, ou em transmissões seriadas em diferentes espécies de plantas (GARCÍA-ARENAL et al.; 2008). A identificação dessa variabilidade contribui para a caracterização de populações ou isolados virais e pode ser alcançada por estudos de: hospedeiros indicadores, proteínas estruturais e genomas, e esses estão respectivamente relacionados às técnicas de detecção biológica, sorológica e molecular (GARCÍA-ARENAL et al.; 2008).

ASGV já foi diagnosticado em todo mundo (DAR, 2013). Atualmente, existem depositados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), dezenove sequências de genomas completos de isolados de ASGV e várias sequências parciais, principalmente da região que codifica a capa proteica (CP). No continente americano, somente o isolado ML de CTLV em citrus, foi totalmente sequenciado (TATINENI et al., 2009).

A frequente ocorrência de infecções mistas, comum no caso do ASGV com as demais espécies virais latentes previamente mencionadas, representa,

entre outros, um obstáculo para uma associação causal exata entre sintomas observados e patogenicidade a um vírus específico (UNTIVEROS, 2007).

Uma alternativa para superar essas dificuldades e possibilitar um estudo preciso de um agente viral e a doença por ele causada, é a construção de um clone de genoma completo (FL-cDNA clone, do inglês Full Length complementary DNA clone). A utilização dessa técnica pode ainda auxiliar nos estudos de genética reversa, desenvolvimento de estratégias antivirais e transcomplementação (BOYER; HAENNI, 1994).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o melhor conhecimento sobre a biologia e características moleculares de dois isolados do vírus ASGV, coletados em duas plantas de macieira, as quais apresentavam diferença quanto à manifestação dos sintomas. Para tal, utilizou-se clonagem e sequenciamento do genoma completo dos isolados, M219-3 e M220, de ASGV, a análise filogenética da sequência de nucleotídeos e aminoácidos dos isolados com as sequências atualmente disponíveis no GenBank, e a construção de um clone infeccioso, a partir do isolado M220, utilizando-se da técnica Gibson Assembly.

2 CAPITULO I – CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Apple stem grooving virus* COLETADOS EM MAÇÃ NO ESTADO DE SANTA CATARINA.

2.1 Introdução

O cultivo da maçã (*Malus domestica*) no Brasil está concentrado na região Sul do país, responsável por aproximadamente 99% da produção (IBGE, 2015). Entre os problemas associados à cultura, como os que levam a perda de qualidade dos frutos e queda na produção está a infecção causada por vírus (ZHAO et al., 2012).

As espécies melhores caracterizadas infectando maçãs são: *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple stem grooving virus* (ASGV) e *Apple mosaic virus* (ApMV) (KUMAR et al., 2011). Enquanto o ApMV (família *Bromoviridae*) causa sintomas aparentes, as demais espécies citadas, pertencentes a família *Betaflexiviridae*, caracterizam-se por geralmente causar infecções latentes em cultivares comerciais (LIU et al., 2013; NEMETH et al., 1986).

A família *Betaflexiviridae* é composta atualmente pelos gêneros: *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Tepovirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus*. O gênero *Capillovirus* apresenta como espécie tipo o ASGV o qual já foi descrito em maçã (JONES; ALDWINCKLE, 1990; MAGOME et al., 1997; NICKEL et al., 2001), Pera (ZHONG-BIN et al., 2010; YOSHIKAWA et al., 1996), damasco (NEMETH, 1986; TAKAHASHI et al., 1990), cereja (KINARD et al., 1996), quivi (CLOVER et al., 2003), citrus, (HERRON; SKARIA, 2000; LOVISOLO et al., 2003; MAGOME et al., 1997), lírio (INOUE et al., 1979) e bambu (TANG et al., 2010). Em plantas e combinações suscetíveis o ASGV causa a necrose na união da enxertia e do floema, acanalamento do lenho e

declínio de plantas, sendo transmitido, de forma natural, por material propagativo ou, artificialmente, por inoculação mecânica.

A detecção de vírus latentes pode consistir na utilização de métodos biológicos, como a indexagem biológica, de simples execução, mas que requer familiaridade para manutenção das plantas indicadoras (lenhosas ou herbáceas) e boa infraestrutura; métodos sorológicos, sendo o mais amplamente utilizado o teste imunoenzimático ELISA, devido sua simplicidade; métodos moleculares, destacando-se a RT-PCR, que em relação à detecção de patógenos, é geralmente mais sensível que ELISA (NICKEL; FAJARDO, 2009).

Atualmente, existem depositadas no GenBank, dezenove sequências de genomas completos de isolados de ASGV (tab. 2) e várias sequências parciais principalmente da CP. No continente americano, somente o isolado de ASGV (CTLV-ML) em citrus foi totalmente sequenciado (TATINENI et al., 2009). No Brasil, Nickel et al. (1999), verificaram a presença de ASGV no Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e posteriormente realizaram a caracterização molecular baseada na análise do gene da proteína capsidial do isolado ASGV UV01, da região Catarinense (NICKEL et al., 2001). No entanto, até o momento, não foi caracterizado o genoma completo de um isolado de ASGV de ocorrência nacional.

Tabela 2. Isolados de ASGV depositados no GenBank.

Isolado de ASGV	Acesso	Hospedeiro	Origem
P-209	NC_001749	Maçã	Japão
Li-23	AB004063	Lírio	Japão
L	D16681	Lírio	Japão
Kumquat 1	AY646511	Citros	Taiwan
LCd-NA-1	FJ355920	Citros	Taiwan
ASGV_kfp	KR106996	Pera	China
CTLV-ML	EU553489	Limão Meyer	EUA
ASGV-CHN	JQ308181	Maçã	China
ASGV-AC	JX080201	Maçã	Alemanha
ASGV T47	KF434636	Maçã	China
ASGV-HH	JN701424	Pera	China
ASGV YTG	KJ579253	Maçã	China
Matsuco	LC084659	Citros	Japão
ASGV P.12	HE978837	Maçã	Índia
CTLV-MTH	KC588948	Citros	China
CTLV-HC	KC588947	Citros	China
CTLV-Pk	JX416228	Citros	Taiwan
Orange	JQ765412	Citros	China
ASGV R	AY596172	Pera	Coréia

O objetivo do trabalho foi a caracterização biológica e molecular de dois isolados de ASGV (M219-3 e M220), coletados em duas plantas de macieira, de mesma origem genética (cultivar: Fuji e porta-enxerto: Maruba), mas expressando diferentes sintomas. Para tal foi realizado: indexação em plantas hospedeiras de ASGV; clonagem e sequenciamento do genoma completo; e análise filogenética da sequência de nucleotídeos e aminoácidos dos isolados, em comparação entre si, e com sequências atualmente disponíveis no GenBank.

2.2 Material e Métodos

Os materiais e métodos utilizados buscam cumprir as seguintes etapas (Fig 3), visando a caracterização biológica e molecular dos dois isolados de ASGV.

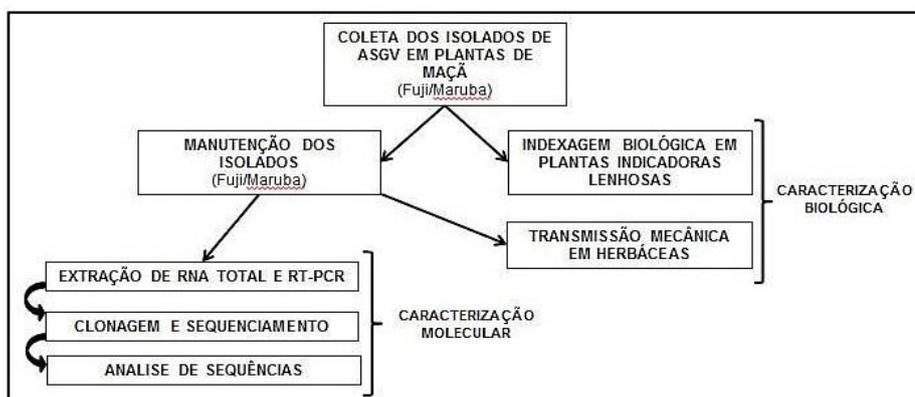


Figura 3. Representação esquemática resumida das etapas descritas nos materiais e métodos

2.2.1 Local de desenvolvimento do trabalho

O trabalho foi desenvolvido, durante o ano de 2014 e início de 2016, na Embrapa Uva e Vinho, no município de Bento Gonçalves (Rio Grande do Sul/BR), no laboratório de Virologia Vegetal e casas de vegetação da unidade. Durante o ano de 2015, foi conduzido (transmissão mecânica em herbáceas, clonagem, sequenciamento e análise de sequências) no laboratório de Virologia Vegetal do Instituto Julius Kühn (JKI), unidade de Dossenheim, Alemanha.

2.2.2 Identificação e manutenção dos isolados virais

Os isolados utilizados são provenientes do município de São Joaquim, na região serrana de Santa Catarina, oriundos de uma planta com fortes caneluras e outra com ausência de sintomas, e nomeados respectivamente de M219-3 e M220. Os isolados foram coletados em janeiro de 2014 e mantidos por enxertia em plantas de maçã cv. Fuji, e na forma de extrato de RNA total, a -20°C .

Após a coleta do material vegetal em campo, as amostras foram testadas, por RT-PCR, para os vírus ASGV, ACLSV, ASPV e ApMV, sendo positivas para ASGV e ACLSV.

2.2.3 Caracterização biológica

A indexagem foi realizada por enxertia de borbulhas no porta-enxerto a partir do material coletado, e acima destas foi realizada a enxertia por estacas das lenhosas indicadoras: *M. domestica* cv. Radiant Crab (RC) e cv. Lord Lambourne (LL-S5), *M. micromalus* GMAL 273 (MM), *M. platycarpa* (MP) e *Pyronia veitchii* (PV). O desenvolvimento de sintomas foi registrado ao longo de dois anos, e, na sequência foi realizada RT-PCR para detecção de ASGV e ACLSV. Foram utilizadas três repetições por indicadora, para cada isolado

A partir de extratos aquosos das plantas que continham os dois isolados virais, foi realizada a inoculação mecânica via solução tamponada em fosfato de potássio 0,05 M, pH 7.2, contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v), em folhas jovens das herbáceas *Nicotiana occidentalis* 37B, feijão e pepino. Devido a não observação de sintomas de ASGV nas plantas inoculadas, a transmissão foi verificada via RT-PCR, 10 a 15 dias depois do processo da inoculação das plantas. Plantas exibindo sintomas de ACLSV também foram analisadas via RT-PCR.

2.2.4 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de 100 mg de folhas maceradas em nitrogênio líquido e o kit *RNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, este RNA foi utilizado nas reações de RT-PCR para obtenção dos fragmentos de ASGV destinados à clonagem.

O RNA total, a partir das plantas lenhosas indicadoras e herbáceas inoculadas, foi extraído por captura em sílica (ROOT; JELKMANN, 2001).

2.2.5 Reação de transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia - RT-PCR

Para a síntese do cDNA, aproximadamente 200 ng de RNA total foram utilizados em uma reação contendo 0.5 µl do oligo-DT, 1 µl de mistura de dNTPs (deoxinucleotídeos trifosfatados: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a 2,5 mM cada, e ajustada com água tratada com DEPC, para um volume de 13 µl. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Decorrido o tempo foram adicionados à reação 4 µl de tampão (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM e

MgCl₂ 15 mM), 1 µl de DTT a 0,1 M, 28 unidades de inibidor de RNase (Promega), e 200 unidades de transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen). A mistura, em um volume final de 20 µl, foi incubada a 50 °C por 1 hora e 70 °C por 15 minutos.

Para a amplificação dos fragmentos do genoma via PCR foi usado a DNA Polimerase *Taq* Platinum (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As condições de reação foram de desnaturação inicial à 94 °C por dois minutos, 34 ciclos de 94 °C por 50 segundos, temperatura de pareamento, de acordo com a T_m (*melting temperature*) dos pares de oligonucleotídeos testados, e 72 °C por 50 segundos, e 10 minutos de extensão final a 72 °C. Os oligonucleotídeos utilizados foram inicialmente desenhados a partir da sequência de referência do genoma do ASGV (NC_001749). Na continuação, oligonucleotídeos desenhados com base nas sequências dos próprios fragmentos, foram utilizadas conforme as sequências foram sendo obtidas (tab. 3 e Fig. 4).

Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,2%, corados em brometo etídeo e purificados usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Para verificar o sucesso da transmissão mecânica nas plantas lenhosas, e em *N. occidentalis* 37B, uma RT-PCR foi realizada. O cDNA foi sintetizado com aproximadamente 200 ng de RNA total, primeiramente em uma reação contendo 1 µl do oligo-DT, e água (tratada com DEPC) para um volume de 10 µl. A reação foi incubada a 80°C por 2 minutos. Decorrido o tempo foi adicionado à reação 5 µl de tampão (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM e MgCl₂ 15 mM), 1 µl de mistura de deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a 2,5 mM, 28 unidades de inibidor de RNase, e 200 unidades de transcriptase reversa MMLV- RT (Promega), e água (tratada com DEPC) para um volume de 25 µl. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Para a detecção via PCR foram utilizados os oligonucleotídeos ASGV 5641 e ASGV 6396, responsáveis pela amplificação do fragmento de ASGV correspondente a CP e a DNA Polimerase *Taq* (Ludwig), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,2%, corado em brometo etídeo.

Tabela 3: Lista de pares de oligonucleotídeos, utilizados para sequenciamento do completo genoma dos isolados M219-3 e M220, respectivas temperaturas usados para pareamento (T_m).

	PRIMER S	PRIMER AS	SEQUÊNCIA	T_m
A	1-ASGV	2-ASGV	AAATTTAACAGGCTTAATTTCC GAACTTTTGGAAATTTGTTACG	55 °C
F	5-ASGV	6-ASGV	CAATGGGTCAAAGACAAATTTTG GATATGTCTTCATTTACCAAAAA	58 °C
N	13-ASGV	18-ASGV	GGACCCATGTTGAGAGCAATTGA TGGCAGCAAAGGTTTTCAATTC	55 °C
Q	ASGVF5641	20-ASGV	ATGAGTTTGAAGACGTGCTTC AGAGTGGACAAACTCTAGACTC	58 °C
S	7-ASGV	10-ASGV	TTTTTGGTAAATGAAGACATATC TTATAAAGGCATTATGAACA	58 °C
W	15 -ASGV	R 5659	CTTTACACAATTTTGAAGAAGA AGCACGTCTTCCAAACTC	58 °C
Z	13 - ASGV	16 - ASGV	GGACCCATGTTGAGAGCAATTGA AGAGCAAACAACCTCAGTGTCTG	58 °C
c	SG495 F	6-ASGV	TGGTCTTAGAGATCAATGCCTC GATATGTCTTCATTTACCAAAAA	55 °C
e	SG1312 F	6-ASGV	TCATCCTGGACAAAGTCAACT GATATGTCTTCATTTACCAAAAA	55 °C
l	5-ASGV	SG2807 R	CAATGGGTCAAAGACAAATTTTG ATCGTCTTGATCATGAGGTCA	55 °C
m	SG2589 F	SG3978 R	GTACCCACCTGGATACCTTACA GCACTTTCAATTGCTCTCAACAT	55 °C
n	SG2589 F	12-ASGV	GTACCCACCTGGATACCTTACA TCAATTGCTCTCAACATGGGTCC	55 °C



Figura 4. Estratégia utilizada para amplificação, clonagem e sequenciamento do genoma completo dos isolados M219-3 (a) e M220 (b).

2.2.6 Clonagem e sequenciamento do genoma do isolado ASGV

As técnicas básicas de clonagem e eletroforese foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Sambrook e Russel (2001).

Os fragmentos de DNA amplificados e purificados, foram clonados em vetor pGEM-T-EASY (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da reação de ligação foram transformados em *Escherichia Coli* estirpe DH5 α . As colônias transformadas, com os possíveis clones, foram repicadas para meio LB líquido e incubadas a 37°C /12 horas. Após esse período os plasmídeos recombinantes foram purificados utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) e digeridos com a enzima *EcoRI* para confirmação da presença do fragmento desejado. Os clones virais confirmados foram enviados para sequenciamento na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (www.cenargen.embrapa.br), baseado em dideoxinucleotídeos, segundo método Sanger (SANGER; COULSON; 1975).

2.2.7 Análise das sequências virais

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes aos isolados, foram comparadas entre si, e com seqüências de isolados de ASGV disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Alinhamentos foram obtidos utilizando-se o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994). A partir dos alinhamentos foram preparadas árvores filogenéticas utilizando-se o programa Lasergene (DNASar Inc. Madison, USA), utilizando-se o método de *neighbor joining*. Os ramos das árvores foram testados por bootstrap, com 2.000 repetições.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Caracterização biológica

As plantas lenhosas indicadoras inoculadas com os isolados M219-3 e M220 foram observadas ao longo de dois anos. A expressão de sintomas e associação à detecção por RT-PCR, para cada cultivar foi verificada(tab. 3):

- RC: isolado M219-3, morte de duas plantas e uma planta pouco desenvolvida (positiva para ASGV); isolado M220, morte de duas plantas e uma planta apresentando machas foliares nos ramos mais jovens (positiva para ASGV).

- LLS5: para ambos isolados foi observada a morte de duas plantas e uma planta não apresentando sintomas de infecção viral, embora positiva para ASGV, por RT-PCR.
- PV: para ambos isolados foi observada a morte de duas plantas. Uma planta do isolado M219-3 apresenta manchas cloróticas (positiva para ASGV) e uma planta do isolado M220 apresentando clorose (positiva para ASGV).
- MM: com ambos isolados foi observada a morte das três plantas enxertadas.
- MP: isolado M219-3, morte de uma planta e duas plantas apresentam deformação foliar (positivas para ASGV); isolado M220, morte de duas plantas e uma planta não apresentou sintomas aparentes de infecção viral (positiva para ASGV).

Baseando-se nesses resultados pode-se concluir que os isolados se comportaram de forma similar, quanto aos sintomas morfológicos, para as quatro primeiras lenhosas descritas. A enxertia em RC e PV causou morte de duas plantas e manifestação de sintoma em outra. No entanto, os sintomas entre os dois isolados foram diferentes. Na cultivar MM, foi observada a morte de todas as plantas, e na cultivar LLS5 registrou-se morte de duas plantas e uma planta vigorosa, para cada isolado.

Já na cultivar MP, registrou-se a morte de uma planta e expressão de sintomas em duas, com M219-3, enquanto que com M220, se observa, novamente, morte de duas plantas e uma planta vigorosa.

Considerando exclusivamente o sintoma “morte de planta”, sugere-se que o mesmo ocorreu em decorrência da infecção viral, uma vez que a falha no processo de enxertia foi descartada, pois foi observada perfeita união dos tecidos vegetais.

Embora quase todas as plantas testadas via RT-PCR deram resultados positivos para ASGV, não se pode excluir um possível envolvimento de ACLSV. Ainda cabe destacar que a estação (verão) em que foram realizados os testes moleculares, pode ter comprometido a detecção. Associada a esta observação o fenômeno de silenciamento gênico, é conveniente ressaltar que a atividade sistêmica de silenciamento pode ter efeito protetor em plantas, contra infecções virais, sob temperaturas de até 27 °C (SIZTTYA et al.; 2003). Outro fato pertinente é a deformação foliar apresentada na cultivar MP, isolado M219-

3, anteriormente descrita (NICKEL; FAJARDO, 2009) como sintoma típico decorrente da infecção de ACLSV.

Na indexagem biológica por inoculação mecânica com todos os isolados, não foi verificada a presença de sintomas nas três espécies herbáceas. Há relatos de sintomas provocados por essa espécie viral quando inoculada em feijão (necrose foliar sistêmica), pepino (clorose de nervuras) e *Chenopodium quinoa* (manchas, anéis e mosqueados cloróticos, epinastia verde-escura, distorção e redução de tamanho foliar, e nanismo) (NICKEL; FAJARDO, 2009). No entanto, devido a dificuldades de obtenção das plantas, não foi possível realizar inoculações nesta última espécie vegetal citada.

Uma constatação relevante, está relacionada à taxa de transmissão de ACLSV para *N. occidentalis* 37B. Como mencionado anteriormente, M219-3 e M220 foram diagnosticados positivamente também para esse vírus. No entanto, durante o processo de transmissão mecânica, foi verificado, via RT-PCR e observação de sintomas, que a taxa de transmissão de ACLSV foi geralmente inferior à de ASGV.

A caracterização biológica aqui apresentada, não permite inferências precisas quanto à diferença de sintomas causados pelos isolados M219-3 e M220, principalmente no que tange à agressividade, sendo que essa foi a característica que fenotipicamente diferenciou os isolados em campo.

Tabela 4. Demonstração dos resultados da RT-PCR para as plantas lenhosas enxertadas com os isolados. As imagens retratam as plantas remanescentes até fevereiro de 2016.
 RC (*M. domestica* cv. Radiant Crab); MM (*M. micromalus* - GMAL 273); MP (*M. platycarpa*); PV (*P. veitchii*); e LLS5 (*M. domestica* cv. Lord Lambourne).
 (-) negativo; (+) positivo; (0) não testado; (?) resultado dúbi

Indicadora	219-3	RT-PCR ACLSV - ASGV		220	RT-PCR ACLSV - ASGV	
		-	+		-	+
RC	 duas plantas mortas	-	+	 duas plantas mortas	-	+
LLS5	 duas plantas mortas	-	+	 duas plantas mortas	?	+
PV	 duas plantas mortas	-	+	 duas plantas mortas	?	-
MM	Morte das três plantas	0	0	Morte das três plantas	0	0
MP	 uma planta morta	?/?	+/+	 duas plantas mortas	?	+

2.3.2 Caracterização molecular

O genoma completo sequenciado dos dois isolados está em concordância com o descrito anteriormente na literatura (YOSHIKAWA et al.; 1992). Os isolados M219-3 e M220 apresentaram 6495 nt, excluindo a cauda poli-A, distribuídos em duas ORFs. A ORF1, de 6318 nt, que codifica uma poliproteína de 241kDa, iniciando na posição 36 e terminando na posição 6354 do genoma. A ORF2, sobreposta à ORF1, indo da posição 4788 até a posição 5750 e codificando uma proteína de 36 kDa (proteína de movimento).

Comparando a identidade de nucleotídeos do genoma dos isolados com os disponíveis no banco de dados (Genbank), o isolado M219-3 apresentou máxima identidade com o isolado KF434636 (China), enquanto o isolado M220 apresentou máxima identidade com a sequência referência NC0011749 (Japão). Ambos isolados apresentaram menor percentagem de identidade com o isolado chinês KR106996 (80.1% e 79.8, respectivamente) (tab. 5)

Tabela 5. Comparação da identidade de nucleotídeos e aminoácidos (ORF1, ORF2 e CP) dos M219-3 e M220, com as sequências disponíveis no GenBank (genoma completo)

Isolados de ASGV	%IDENTIDADE DO GENOMA (nt)		% IDENTIDADE DE AA					
			ORF 1		ORF 2		CP	
	M219-3	M220	M219-3	M220	M219-3	M220	M219-3	M220
M219-3 Brasil	*	92.2	*	92.3	*	95.3	*	93.3
M220 Brasil	92.2	*	92.3	*	95.3	*	93.3	*
NC0011749 Japão	92.2	97.1	92.3	98.2	95.0	98.4	94.5	98.3
LC084659 Japão	81.5	81.7	87.3	87.2	96.9	95.6	93.3	94.1
AB004063 Japão	82.5	83.0	87.7	87.8	96.3	95.0	96.2	97.1
AY646511 Taiwan	81.5	81.8	87.1	87.5	96.3	95.6	93.7	94.5
D16681 Japão	82.5	83.0	88.1	88.2	96.3	95.0	96.2	97.1
EU553489 EUA	82.0	81.5	87.8	86.6	96.6	96.0	95.8	93.3
FJ355920 Taiwan	81.4	81.8	87.6	87.4	95.3	96.6	94.5	95.4
HE978837 Índia	81.3	81.7	**	**	**	**	95.4	96.2
JN701424 China	86.2	86.7	89.4	90.2	93.8	94.4	95.8	95.8
JQ308181 China	86.2	85.9	89.2	90.2	93.8	94.1	94.5	95.4
JQ765412 China	81.4	81.6	87.0	87.3	96.6	95.0	92.9	94.1
JX080201 Alemanha	82.0	82.5	87.7	87.9	96.3	97.2	95.8	96.6
JX765412 Taiwan	81.6	81.9	87.2	87.2	96.6	96.0	91.6	92.9
KC588947 China	81.2	81.3	86.7	86.9	95.3	94.7	92.4	93.7
KC588948 China	88.3	90.4	90.6	93.6	97.2	95.6	94.1	95.0
KF434636 China	92.8	96.6	92.6	98.1	94.4	96.6	94.5	98.7
KJ579253 China	85.5	86.7	88.2	88.9	97.2	97.2	97.1	96.2
KR106996 China	80.1	79.8	**	**	**	**	**	**
ASGV UV01 Brasil	***	***	***	***	***	***	95.8	96.6
AY596172 Coreia	80.3	79.6	85.8	85.6	94.7	93.1	97.9	93.7

* Comparação do isolado entre si;

** Qualidade da sequência depositada não permite comparação da região;

*** Sequência correspondente apenas à capa proteica.

A porcentagem de identidade entre os isolados, quando comparando a sequência de aminoácidos da ORF1, foi de 92.3%. Quando comparados com as demais sequências, pode-se observar que M220 apresentou maior identidade com os isolados NC0011749, KF434636 e KC588948 (98.2%, 98.1% e 93.6%, respectivamente) (tab. 5).

Considerando a CP e ORF2 (relacionada com a proteína de movimento), M220 apresentou maior identidade da sequência de aminoácidos, novamente com NC0011749 e KF434636, enquanto M219-3, com o isolado norte americano, EU553489. O isolado brasileiro ASGV UV01 (descrito por Nickel, 2001) apresentou 100% de identidade com o isolado alemão JX080201 (tab. 5), considerando a sequência de aminoácidos da CP.

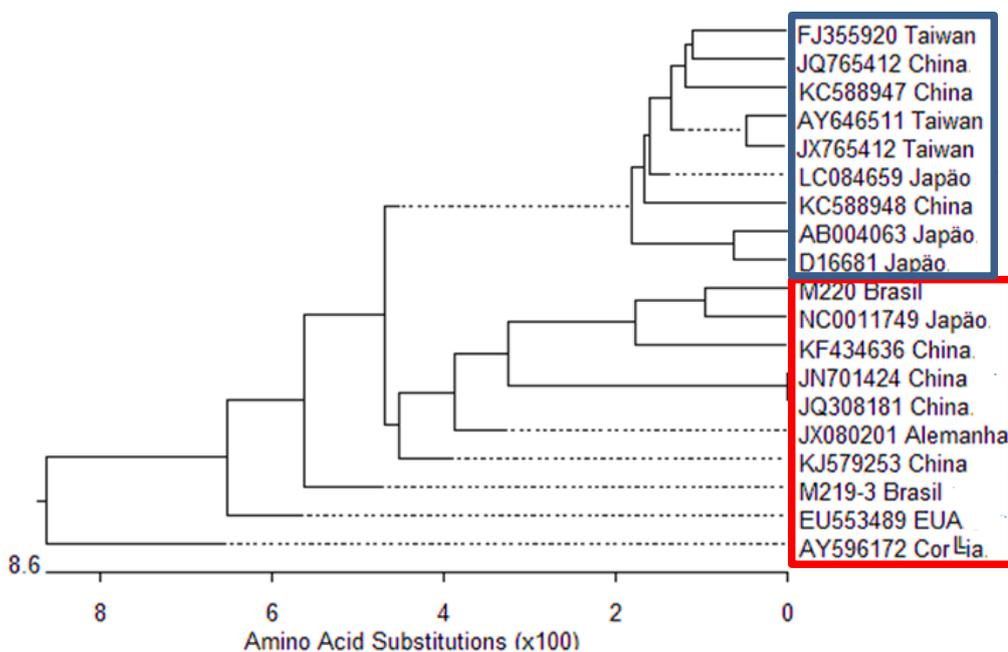


Figura 5. Árvore filogenética construída a partir das sequências de aminoácidos da ORF2 (MP) entre M219-3, M220 e demais isolados.

Com base nos resultados observados na comparação da sequências de aminoácidos, constatou-se que o isolado M219-3 ficou mais próximo do isolado norte americano, enquanto M220 aproximou-se mais dos isolados asiáticos. No entanto, considerando que a maior parte dos isolados de ASGV, aqui

comparados, são do continente asiático, não se pode inferir sobre diferenças precisas quanto à origem geográfica entre os acessos apresentados.

Estudos relatam que uma mutação na posição 4646 pode causar expressiva mudança na expressão de sintomas (HIRATA et al.; 2003). No entanto, essa mutação não foi observada nos isolados.

A análise das duas regiões determinadas variáveis (V1: posição dos aminoácidos entre 532 – 570, e V2: posição dos aminoácidos entre 1583-1868) entre isolados de ASGV, sugere que a diversidade da espécie está relacionada às diferentes espécies de plantas hospedeiras em vez da origem geográfica (LIEBENBERG et al.; 2012). Esse fato pode ser observado no presente trabalho. As sequências avaliadas agruparam-se em dois distintos grupos filogenéticos, quando comparadas as sequências de aminoácidos da ORF2 (compreendendo a região variável V2). No primeiro grupo (retângulo azul), encontram-se os acessos isolados a partir de citrus e lírio, enquanto no segundo (retângulo vermelho), encontram-se acessos, incluindo M219-3 e M220, predominantemente isolados a partir de maçã e pera (Fig. 5).

2.4 Conclusões

Os isolados M219-3 e M220 não apresentaram diferenças consideráveis quanto à caracterização biológica, pois comportaram-se de forma bastante similar quanto à expressão dos sintomas.

Os resultados obtidos permitiram a obtenção das primeiras sequências genômicas completas de isolados brasileiros de ASGV. A identidade entre M219-3 e M220 foi de 92.2%, quando comparada a sequência de nucleotídeos, e 95.3% e 93.3%, quando comparadas as sequências de aminoácidos da ORF2 (proteína de movimento) e capsídeo, respectivamente. A análise filogenética da proteína de movimento dos isolados com as sequências depositadas determinou dois grupos distintos quanto ao hospedeiro. M219-3 e M220 agruparam-se no cluster cujo os hospedeiros eram predominantemente maçã e pêra.

3 CAPITULO II – CONSTRUÇÃO DE UM CLONE INFECCIOSO A PARTIR DO ISOLADO M220 DE *Apple stem grooving virus*

3.1 Introdução

O estudo de vírus induzindo doenças em plantas se depara com algumas barreiras, tais como a dificuldade em cumprir os postulados de Koch (YOUSSEF et al., 2011). A modificação feita por L. Bos (1981), para adaptar esses postulados aos agentes virais, permitiu identificar o papel de muitos vírus relacionados a doenças. Mesmo assim alguns entraves ainda permanecem, tais como: problemas relativos à purificação viral e a inoculação a partir de partículas purificadas, bem como a identificação viral em diferentes plantas herbáceas hospedeiras. A frequente ocorrência de infecções mistas representa outro obstáculo para uma associação entre sintomas e patogenicidade de um vírus específico (UNTIVEROS; 2007), fato recorrente especialmente em culturas de propagação vegetativa.

Uma alternativa para superar essas dificuldades e associar inequivocamente um agente viral à doença por ele causado, é a construção de um clone de DNA complementar de genoma completo (FL-cDNA clone, inglês: *full length complementary DNA clone*) ou DNA clone, no caso de vírus que possuem o genoma constituído por DNA. A utilização dessa técnica pode ainda auxiliar nos estudos de genética reversa, desenvolvimento de estratégias antivirais e transcomplementação (BOYER; HAENNI; 1994).

Em nível molecular, o estudo de não-retrovírus ou de vírus cujo genoma não seja composto por DNA, como o *Apple stem grooving virus* (ASGV), contemplado no presente trabalho, apresenta um obstáculo adicional, pelo fato destes vírus não apresentarem um DNA intermediário na sua fase replicativa. No entanto, a possibilidade de obter clones infecciosos, como cDNA ou cópias

de RNA transcritos *in vitro*, ampliou potencialmente a possibilidade de pesquisas com esses agentes infecciosos, facilitando inclusive o estudo de vírus presentes em baixa titulação ou aqueles difíceis de serem isolados (YOUSSEF et al., 2011).

Entre os fatores limitantes para a construção de um FL-cDNA clone, a partir de um transcrito infeccioso, pode-se mencionar: que o processo pode ser trabalhoso e demorado; a otimização e padronização de um protocolo que contemple um grande grupo de espécies virais é difícil; necessidade de uma perfeita junção entre extremidade da sequência viral e o gene promotor; o transcrito obtido mesmo que infeccioso, pode ser originário de um cDNA viral incompleto (DAVIS e al., 1989; KLUMP et al., 1990); a dificuldade que alguns genomas apresentam para obtenção da primeira fita do cDNA, provavelmente devido à presença de fortes estruturas secundárias presentes no RNA viral; clonagem dificultosa para grandes moléculas de cDNA; e ainda a alta instabilidade do clone quando inserido na bactéria, a qual pode ser atribuída a um potencial tóxico e/ou instabilidade de algumas sequências virais (BOYER; HAENNI, 1994; YANG et al., 1998; YOUSSEF et al., 2011).

A construção de um clone infeccioso pode ser obtida através da abordagem clássica de montagem de DNA (inglês: *DNA assembly*), ou seja utilizando o método tradicional de sítio de clonagem múltipla (MCS, inglês: *Traditional Multiple Cloning Site*), com o uso de enzimas de restrição, tal como já empregado para construção de clones de ASGV e *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) (TERAUCHI et al., 1997; SATOH et al., 1999). E ainda, por meio de estratégias independentes de sítio de restrição, permitindo a obtenção da construção do conjunto FL cDNA viral + vetor binário, em número reduzido de etapas, podendo tanto o cDNA viral, quanto o vetor serem obtidos a partir de uma única Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de comprimento total (FL-PCR, do inglês *Full Length Polymerase Chain Reaction*) (ELLIS et al., 2011).

Excetuando-se a abordagem clássica (MSC) outras estratégias que têm se tornado rotineiras nos laboratórios incluem BioBric (SHETTY, 2008), Golden Gate (ENGLER, 2008), Sequence and Ligase Independente Cloning (SLIC) (LI 2007), Seamless Ligation Cloning Extract (SLiC) (ZHANG, 2012), Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) (QUAN; TIAN 2009), In-

Fusion® Cloning (Clontech) e Gibson DNA Assembly® (GIBSON, 2009). Os três últimos relacionados têm sido empregados para obtenção de clones infecciosos de vírus em maçã, no Instituto Julius Kühn, onde o presente trabalho foi realizado, e serão sucintamente abaixo descritos.

CPEC, caracterizada como uma extensão de sobreposição – PCR (OE-PCR, inglês: *overlap extension*) que utiliza o ciclo de PCR, sem o uso de oligonucleotídeos, para circularizar um gene ou um genoma em um plasmídeo linearizado. Este método é dependente da sobreposição de uma sequência de 20 a 25 pb nas extremidades da sequência a ser inserida, a qual é homologa as extremidades do vetor linearizado. O ciclo simples dessa PCR utiliza uma DNA polimerase de correção de alta fidelidade e a reação de ligação inserto-vetor é então usada para transformação (QUAN; TIAN, 2009).

Entre os kits comerciais mais promissores para montagem do DNA está o In-Fusion® Cloning, que utiliza uma mistura de enzimas para montar fragmentos que apresentam exatamente 15 pb de sobreposição com o plasmídeo a ser utilizado (ELLIS et al., 2011). Já o método de Gibson, utiliza de uma DNA polimerase de alta fidelidade, uma T5 exonuclease e uma DNA ligase, atuando a 50°C por um período que pode variar de 15 a 60 minutos (GIBSON et al., 2009).

Tanto In-Fusion® Cloning quanto Gibson DNA Assembly® podem ser utilizados para montagem de dois ou três fragmentos e conceitualmente pertencem a uma classe de técnicas de montagem de sobreposição, também chamadas de *chew back* (“mastigação regressiva”) e pareamento, que utilizam uma mistura de diferentes enzimas a uma mesma temperatura (reação isotérmica) (ELLIS et al., 2011).

Uma técnica que pode ser aplicada a fim de aprimorar os três métodos descritos e que pode dispensar a linearização do plasmídeo, é a digestão do mesmo com *DpnI*, uma enzima de restrição que elimina todo DNA plasmidial circular não produzido pela PCR (ELLIS et al., 2011).

Dois métodos de transcrição podem ser usados para verificar a infectividade do cDNA clone obtido. Na estratégia *in vitro* a sequência viral é anexada a um plasmídeo cujo promotor é T7 ou SP6 (oriundos de bacteriófagos), enquanto na estratégia *in vivo*, desenvolvida nesse trabalho, a

sequência viral é ligada a um vetor binário, responsável pela transformação genética em plantas.

Vetores binários são sistemas em que o T-DNA (inglês: *transfer DNA*) e os genes *vir* estão localizados em diferentes replicons. São estruturas artificialmente construídas, adaptadas uma vez que o Ti plasmídeo (inglês: *tumor inducing plasmid*) de *Agrobacterium tumefaciens*, em virtude de seu tamanho, não pode ser manipulado diretamente. Os vetores binários apresentam como principais características: extremidades direita e esquerda de sequências repetidas que delimitam e definem o T-DNA; gene marcador de seleção para atividade de plantas; origem de replicação em *Escherichia coli* e *A. tumefaciens*; sítio de endonucleases de restrição; e genes de resistência a antibióticos para seleção do vetor na bactéria (HOEKEMA et al., 1983; BEVAN, 1984; LEE et al., 2008). Um dos promotores mais utilizados é o 35S (originário do *Cauliflower mosaic virus* – CaMV), o qual permite a transcrição direta do FL-cDNA clone, no interior da célula vegetal (TERAUCHI et al., 1997).

A heterogeneidade da população transcrita, a ocorrência de mutações e a sequência das extremidades do genoma, são alguns fatores que podem influenciar na infectividade do clone. Como vantagens da expressão de RNAs virais infecciosos por transcrição *in vivo* podemos relacionar: a menor dependência da infectividade em relação à degradação do RNA e a independência da expressão de genes virais do processo de replicação. No entanto, alguns riscos podem ser assumidos durante a execução desse processo, tais como: alguns transcritos podem ser mais infecciosos do que o tipo viral selvagem; nem sempre é possível demonstrar se esta sequência transcrita é idêntica à fonte viral originalmente utilizada; e os transcritos infecciosos estão sujeitos a eventos de recombinação ou modificações genéticas. A transcrição *in vivo* é realizada em plantas com potencial hospedeiro, através do processo de transformação estável (transgenia) (BOYER; HAENNI, 1994) ou transiente.

O objetivo do trabalho foi a obtenção de um clone infeccioso de ASGV, a partir do isolado brasileiro M220, utilizando-se do método Gibson para construir um FL-cDNA clone em vetor binário, verificando a infectividade do mesmo *in vivo*.

3.2 Material e Métodos

Os materiais e métodos utilizados buscam cumprir as seguintes etapas visando a obtenção do clone infeccioso (Fig. 8).

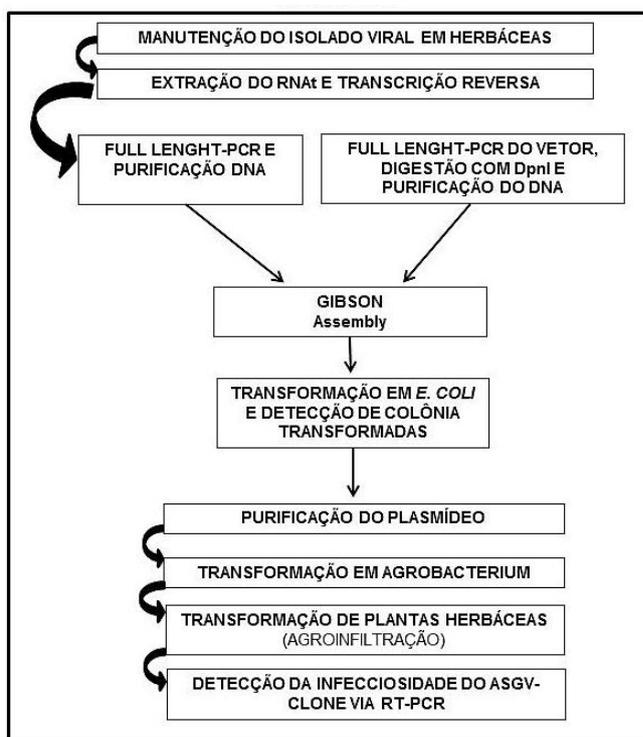


Figura 6. Representação esquemática resumida das etapas descritas nos materiais e métodos

3.2.1 Local de desenvolvimento do trabalho

O trabalho foi desenvolvido, durante o ano de 2015, no laboratório de Virologia Vegetal do Instituto Julius Kühn (JKI), unidade de Dossenheim, na Alemanha.

3.2.2 Identificação e manutenção do isolado viral

O isolado viral utilizado, nomeado M220, é o mesmo caracterizado no capítulo 1. O isolado foi mantido por enxertia na cultivar Fuji, em casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves. As folhas foram liofilizadas e transportadas para o JKI. Em decorrência da baixa concentração de RNA total extraído a partir do material liofilizado, o mesmo foi utilizado para

transmissão mecânica, em solução de 0.01 M fosfato, para a infecção de plantas herbáceas, *Nicotiana occidentales* 37B.

3.2.3 Extração de RNA total

A extração de RNA total para a construção de clones foi realizada com o kit comercial RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. No entanto, para detecção de ASGV em plantas herbáceas infectadas e transformadas, foi utilizado o método de RNA total por captura em sílica (ROOT; JELKMANN, 2001).

3.2.4 RT-FL-PCR e RT-PCR

A reação de síntese do cDNA foi realizada utilizando-se a RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (RT) (Thermo Scientific Fischer), seguindo as instruções do fabricante. Para demais reações, visando a detecção de ASGV em plantas herbáceas inoculadas, foi utilizada a RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Scientific Fischer), seguindo as instruções do fabricante. Em ambas reações o oligonucleotideo reverso utilizado foi Oligo dT (18 nt).

A reação de FL-PCR foi realizada com a DNA polimerase Precisor High Fidelity (BioCat®), utilizando os oligonucleotideos: ASGVFu3F e ASGVFu3R, desenhados para amplificar o genoma completo do isolado de ASGV, com uma sobreposição de 15 pb com o vetor (pv297) (Fig. 10).

Após a reação o fragmento desejado obtido, aplicado em gel de agarose 1% e 100 volts, foi purificado com o kit comercial QIAquick® Gel Extraction (Qiagen).

Para detecção de ASGV nas colônias transformadas e plantas herbáceas inoculadas por transmissão mecânica ou transformadas, foi utilizada a FastGene® DNA Polymerase (Nippon Genetic Europe), seguindo instruções do fabricante e com os oligonucleotideos: ASGV5641F e ASGV6396R (755 pb; descritos no capítulo I).

3.2.5 Preparação do Vetor binário

O vetor binário pv297 (Dr. E. Maiss) utilizado tem o tamanho de 4309 pb, e apresenta o promotor 35S (Fig. 9).

O pv297 foi preparado pela reação de FL-PCR, utilizando os oligonucleotídeos 2888F e 2887R (Fig. 9). As condições da PCR foram desnaturação inicial a 98 °C por 2 min, realização de 35 ciclos: 98 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 min e 30 segundos, seguidos por 5 minutos de extensão final a 72 °C. Após a PCR, 5 µl da reação foram aplicados em gel de agarose a 1%, 100V por 30 minutos.

Após a confirmação de que o fragmento desejado tinha sido amplificado, foi realizada a digestão do fragmento com a enzima DpnI por 30 minutos a 37°C.

Em seguida à digestão, o volume total da reação foi aplicado em gel de agarose a 1%, submetido as mesmas condições de corrida anteriormente descritas. O fragmento de interesse foi excisado do gel e purificado utilizando-se QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen).

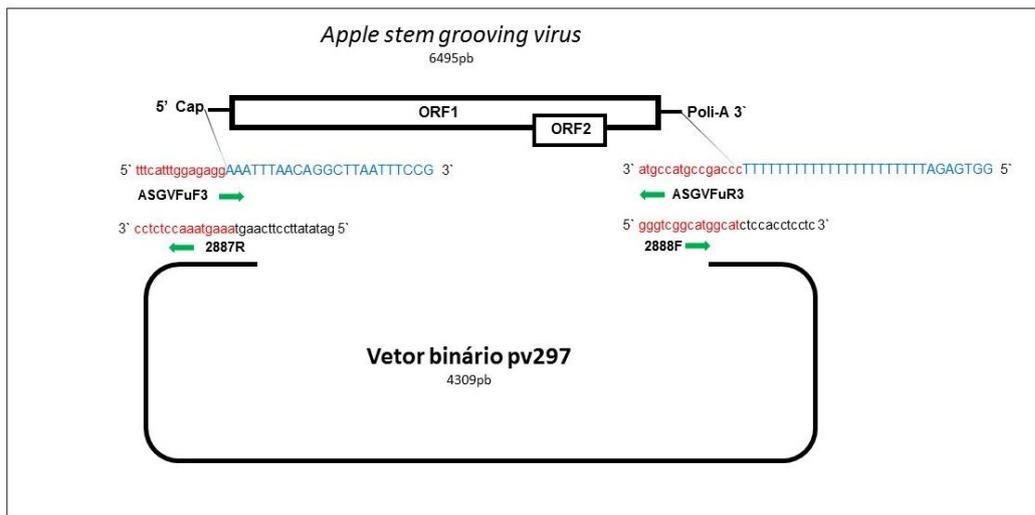


Figura 8. Estratégia de amplificação e clonagem do ASGV (M220) infeccioso, pelo método Gibson. Os oligonucleotídeos usados para obtenção do FL-cDNA e o vetor pv297.

3.2.6 Clonagem e transformação de *Escherichia coli*

A clonagem foi realizada utilizando-se a reação isotérmica de Gibson, seguindo as instruções do fabricante (Gibson Assembly® Cloning Master Mix - New England Biolabs). Foram utilizados 3µl do vetor pv 297 (49 ng/µl), 7µl do cDNA (150 ng/µl) e 10 µl do Master Mix 2X. A reação foi incubada a 50°C por uma hora e imediatamente após esse período, foi realizada a diálise da reação (20µl) em membrana de celulose (0.025µm), em destilada autoclavada, a 4°C por duas horas.

Após esse processo, 2µl da reação foram utilizados para transformação por eletroporação, em 50µl de *E. coli* NEB10β (New England Biolabs). Acrescido de 950µl de meio SOC e com incubação a 37°C, por uma hora.

Transcorrido esse tempo da reação foram plaqueadas em meio LB com agarose e canamicina, duas repetições (volumes 100µl e 200µl). Uma repetição foi incubada a 37°C, por aproximadamente 16 horas e a segunda a 28°C, por aproximadamente 20 horas.

Entre 20 e 30 colônias foram selecionadas por placa, e analisadas por PCR. Aquelas que se mostraram positivas para ASGV, foram incubadas a 37°C, por aproximadamente 16 horas, em meio LB com canamicina. Os clones recombinantes foram purificados, utilizando-se o kit Miniprep Qiagen.

3.2.7 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* (ATHV)

O DNA plasmidial purificado (quantidade 10µl) foi dialisado como descrito em 3.2.6 e 2µl foram utilizados na transformação de *A. tumefaciens* (50µl) por eletroporação. Acrescidos 950µl de meio YEB, procedeu-se com a incubação a 28°C, por duas horas. A reação foi plaqueada em meio YEB, contendo 2% de agarose canamicina e rifampicina, nos volumes 100µl e 200µl, e incubada a 28°C, por aproximadamente 48 horas. Foram selecionadas 10 colônias por placa, e analisadas por PCR. Aquelas positivas para ASGV, foram cultivadas a 28°C, por aproximadamente 24 horas, em meio YEB contendo canamicina e rifampicina, sob agitação (200 rpm).

3.2.8 Transformação de plantas (agroinfiltração)

As plantas de *N. occidentalis* 37B transformadas no experimento, foram mantidas a 25 °C, 40 – 60% de umidade relativa do ar e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Dez dias após a agroinfiltração, as plantas foram analisadas quanto à presença de ASGV, por RT-PCR.

Foram testados dois métodos para transformação de plantas, abaixo descritos:

1) Infiltração Manual - Suspensão de *A. tumefaciens*:

A cultura obtida na etapa anterior foi centrifugada a 5500 rpm, por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento restante foi ressuspenso em 10 ml de MgSO₄ (10mM);

Duas folhas por planta, previamente polvilhadas com carburundum, foram inoculadas com 200 µl da suspensão de *A. tumefaciens* em MgSO₄ e o excesso foi removido com água destilada.

2) Infiltração a vácuo

Em uma adaptação de Shamloul e colaboradores (2014), a cultura obtida na etapa anterior foi centrifugada a 4000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, ressuspenso em meio de indução (1x MS, 10 mM MES, 200µM acetoseringona, 2% sacarose [MMA]) e incubada a temperatura ambiente por três horas. Após esse período a concentração de bactérias foi medida em

espectrofotômetro (A600 para OD 0.5) e as plantas foram infiltradas em câmara de vácuo, sob uma pressão de 50mbar, por um minuto. Transcorrido esse período, o vácuo foi rapidamente interrompido e as folhas foram lavadas com água destilada.

3.3 Resultados e discussão

O experimento realizado possibilitou a construção de um clone infeccioso de ASGV.

O mesmo foi obtido a partir da transformação de *E. coli* à 28°C, enquanto nenhum clone foi obtido quando a bactéria foi submetida a temperatura de 37°C. A incubação a 28°C foi anteriormente relatada como favorável à construção de clones infecciosos a partir de FL-cDNA (BLAWID; NAGATA, 2015).

Uma possível hipótese para essa constatação é de que o crescimento de colônias a uma temperatura inferior à ideal para *E. coli*, poderia atenuar a hiperativação da bactéria e minimizar eventos de mutação (NAGATA, 2015, comunicação pessoal).

Não foram detectados transcritos de ASGV nas plantas transformadas pelo método de infiltração manual. No entanto, sete entre as nove plantas transformadas por infiltração à vácuo, foram positivas via RT-PCR (Fig. 10).

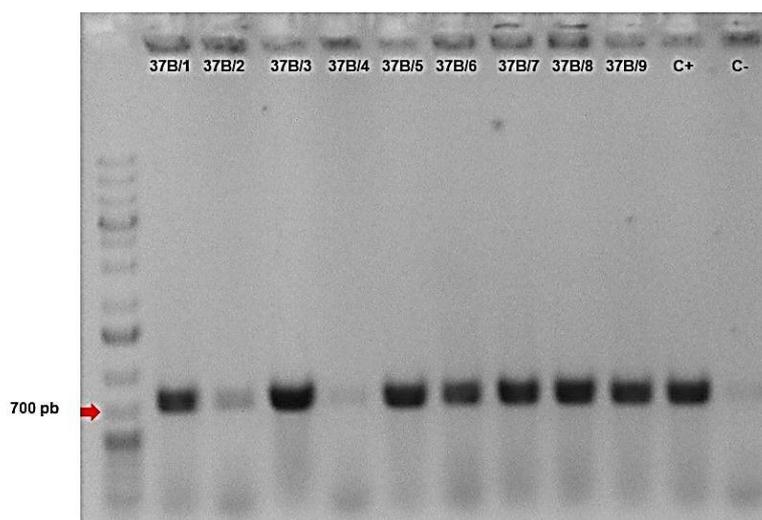


Figura 9. RT-PCR para herbáceas transformadas via infiltração à vácuo (fragmento esperado para ASGV positivo: 755pb).

Devido ao limitado período de tempo para obtenção do clone infeccioso não foi possível repetir o processo de transformação de plantas, para os métodos testados. Esse fato comprometeu também a execução da tentativa de novos métodos, como: biobalística e agroinfiltração via seringa, e transformação em outras espécies de planta, como *Chenopodium quinoa*, e lenhosas indicadoras, descritas na literatura como espécies hospedeiras de ASGV.

3.4 Conclusões

Um clone infeccioso foi obtido a partir do isolado M220, utilizando-se Gibson Assembly®. O método de agroinfiltração eficiente foi a vácuo.

4 Considerações gerais

Considerando que a maioria das sequências de genoma completo de ASGV são originárias de uma mesma região geográfica, a caracterização dos isolados brasileiros, M219-3 e M220, representa um aporte para se ampliar a discussão em torno da variabilidade genética dessa espécie viral, que tamanho impacto tem ocasionado, especialmente na cultura da maçã.

O presente trabalho contribuiu para determinar algumas das condições ótimas para construção de um clone infeccioso de ASGV, tais como: temperatura de incubação para transformação em *E. coli* e eficiência do método de infiltração à vácuo.

No entanto, embora a construção do clone infeccioso tenha sido alcançada, é recomendável que o constructo obtido seja utilizado para transformação de outras espécies vegetais, e até mesmo via outros métodos.

Soma-se a essa sugestão, a discussão de um planejamento para futuros estudos, empregando o clone obtido em experimentos que visem melhor elucidar o envolvimento do ASGV, no declínio do porta enxerto Maruba, vindo ao encontro dos propósitos do emprego dessa técnica, como por exemplo a determinação da associação precisa de um agente viral a determinada doença.

5 5 Referências

ADAMS, M.J.; CANDRESSE, T.; HAMMOND, J.; KREUZE, J.F.; MARTELLI G.P.; NAMBA, S., PEARSON, M.N.; RYU, K.H., SALDARELLI, P., YOSHIKAWA, N. Family Betaflexiviridae In: KING AMQ, ADAMS MJ, CARSTENS EB, LEFKOWITZ EJ (eds) Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, Amsterdam. p 920–941, 2012.

BEVAN M Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12: 8711–8721, 1984.

BLADWID, R.; NAGATA, T. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. **Journal of Virology Methods**, v.222, p.11-15, 2015.

BLEICHER, Jorge. **Historia da macieira**. In: A cultura da macieira. Florianópolis: EPAGRI, p. 29-36, 2006.

BONETTI, J. I. S.; CESA, J. D.; PETRI, J. L.; BLEICHER, J. **Evolução da cultura da macieira**. In: A cultura da macieira. Florianópolis: EPAGRI, p.37-58, 2006.

BOS, L. Hundred years of Koch's Postulates and the history of etiology in plant virus research. *Neth. Journal Path*, v.87, p.91-110, 1981.

BOYER, J.C.; HAENNI, A.L. Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses. **Virology**, v.198, p.415-426, 1994.

CHAVAN, R.R., COHEN, D., BLOUIN, A., PEARSON M N. Characterization of the complete genome of a novel citrivirus infecting *Actinidia chinensis*. **Archives of Virology**, v.158, p. 1679-1686, 2013.

CLOVER, G. R. G., PEARSON, M. N., ELLIOTT, D. R., SMALES, T. E., ALEXANDER, B. J. R. Characterization of a strain of Apple stem grooving virus in *Actinidia chinensis* from China. **Plant Pathol**, v.52, p. 371-378, 2003.

DAR N. A. Apple Stem Grooving Virus – A Review Article. **International Journal of Modern Plant e Animal Sciences**, v.1, n.1, p. 28-42, 2013.

DAVIS, N.L.; WILIS, L.V.; SMITH, J.F.; JOHNSTON, R.E. In vitro synthesis of Venezuelan equine encephalitis virus from a Cdna clone: Analysis of a viable deletion mutante. **Virology**, v.171, p.189-204, 1989.

ELLIS, T.; ADIE, T.; BALDWIN, G.S. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. **Integr. Biology**, v.3, p.109-118, 2011.

ENGLER, C.; KANDZIA, R; MARILLONNET, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability, **PLoS One**, v. 3, 2008, 3647p.

FOASTAT, **disponível em** <www.faostat.fao.org> Acesso em: 02 de dez. 2015.

FOISSAC X.; DUMAS L. S.; GENTIT P.; DULUCQ M. J.; MARAIS A.; CANDRESSE T. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription polymerase chain reaction. A polyvalent detection and characterization tool for trichoviruses, capilloviruses and foveaviruses. **Phytopathol**, v.95, n.6, p.617-625, 2005.

FRIDLUND, P.R. Temperature effects on virus disease symptoms in some Prunus, Malus and Pyrus cultivars. **Washington Agricultural Experiment Station Bulletin**, v. 726, 1970, 6p.

GARCÍA-ARENAL F.; MALPICA J.M.; FRAILE A. **Análisis de la variabilidad de los virus de plantas**. In: Herramientas biotecnológicas en Fitopatología. Ediciones Mundi Prensa. p.135-146, 2008.

GIBSON, D.G.; YOUNG, L.; CHUANG, R.Y.; VENTER, J.C.; HUTCHISON, C.A.; SMITH, H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases, **Nat. Methods**, v.6, p.343-345, 2009.

GILMER R. M.; UYEMOTO J. K. Sap transmission of chlorotic leaf spot and stem-grooving viruses to apple. **Phytopath**, v.62, n.5, p.585-586, 1972.

HERRON, C. M.; SKARIA, M. Further studies on *Citrus tatter leaf virus* in Texas. In: Proceedings 14th Conference of the International. **Organization of Citrus Virologists**, v.14, p.185-194, 2000.

HIRATA H.; YAMAJI H.; KOMATSU H.; KAGIWADA S.; OSHIMA K.; OKANO Y.; TAKAHASHI S.; UGAKI M.; NAMBA S. Pseudo-polyprotein translated from the full-length ORF1 of capillovirus is important for pathogenicity, but a truncated ORF1 protein without variable and CP regions is sufficient for replication. **Virus Res.** v.152, p.1–9, 2010.

HIRATA, H., LU, X., YAMAJI, Y., KAGIWADA, S., UGAKI, M., NAMBA, S. A single silent substitution in the genome of *Apple stem grooving virus* causes symptom attenuation. **J. Gen. Virol.** v.84, p.2579-2583, 2003.

HOEKEMA A, HIRSCH PR, HOOYKAAS PJJ, SCHILPEROORT RA A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179–180, 1983.

HOWELL W.E., MINK G.I., HURTT S. S.; FOSTER J.A.; POSTMAN J. D. Select Malus clones for rapid detection of apple stem grooving virus. *Plant Disease* 80: 1200-1202. 1996.

HULL, R. Comparative plant virology. 2ª edição. **Academy Press**, 2009. 376p.

IBGE, **disponível em**: <www.sidra.ibge.gov.br> Acesso em: 04 de fevereiro. 2016.

INOUE, N., MAEDA, T., MITSUHATA, K. Citrus tatter leaf virus isolated from Lily. **Ann. Phytopathol.** v.45, p.712-720, 1979.

JAMES D. Apple stem grooving virus. In: Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses, **Horticultural Crops**. Texas. v.2, p.37-53, 2008.
JELKMANN W. Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. **Journal of General Virology**, v.76, p.2015–24, 1995.

JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. Compendium of Apple and Pear Diseases. **American Phytopathological Society Press**, Minnesota, 1990. 100p.

KINARD, G. R., SCOTT, S. W., BARNETT, O. W. Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses using RT-PCR. **Plant Dis.** v.80, p.616-621, 1996.

KLUMP, W.M.; BERGMANN, I.; MÜLLER, B.C.; AMEIS, D.; KANDOLF, R. Complete nucleotide sequence infectious of coxsackie vírus Cdna . **J. Virology**, v.64, p.1573-1583, 1990.

KUMAR S.; BINK M.C.A.M.; VOLZ R.K.; BUS V.G. M.; CHAGNÉ D. Towards genomic selection in apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding programmes: Prospects, challenges and strategies. **Tree G. Genomes.** v,8, p.1–14, 2011.

LEE, L.Y.; GELVIN S.B.; T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology* Vol. 146, pp. 325–332. 2008.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.** v.5, p.150-163, 2004.

LI, M.; ELLEDGE, S. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC, **Nat. Methods**, v.4, 2007. 251p.

LIU, P.; ZHANG, L.; ZHANG, H.; JIAO, H.; WU, Y. Detection and Molecular Variability of Apple Stem Grooving Virus in Shaanxi, China. **J Phytopathol**, v.161, p.445–449, 2013.

LOVISOLO, O., ACCOTTO, G. P., MASENGA, V.; COLARICCIO, A. An isolate of *Apple stem grooving virus* associated with Cleopatra mandarin fruit intumescence. **Fitopatol. Bras.** v.28, p.54-58, 2003.

LUCHI, V. L. **Botânica e fisiologia**. In: A cultura da macieira. Florianópolis: EPAGRI, p.59-102, 2006.

MAGOME, H., YOSHIKAWA, N., TAKAHASHI, T., ITO, T., MIYAKAWA, T. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. **Phytopathology**, v.87, p.389-396, 1997.

MAGOME, H., YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T. Single-strand conformation polymorphism analysis of Apple stem grooving capillovirus sequence variants. **Phytopathology**, v.89, p.136-140, 1999.

MACKAY, I.M. et al. Real-time PCR in virology. In: *Nucleic Acids Research* 30(6) 1292-1305, 2002.

MARTELLI G.P.; ADAMS M.J.; KREUZE J.F.; DOLJA V.V. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. **Annu Rev Phytopathol**, v.45, p.73–100, 2007.

NEMETH M. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. **Akademiai Kiado**. Budapest. 1986. 841p.

NICKEL O., FAJARDO, T. V. M., JELKMANN, W., KUHN, G. B. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of Apple stem grooving virus, and its survey in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.655-659, 2001.

NICKEL Osmar. **Doenças causadas por vírus**. In: *Frutas do Brasil*. Maçã: fitossanidade. Bento Gonçalves. p.61-80, 2004.

NICKEL, O.; FAJARDO, T.V.M. Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras. **Documentos 69**. 2009. 53p.

NICKEL, O.; JELKMANN, W.; KUHN, G.B. Occurrence of Apple stem grooving capillovirus in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.444-446, 1999.

OHIRA, K., NAMBA, S., ROZANOV, M., KUSUMI, T., TSUCHIZAKI, T. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of *citrus tatter leaf capillovirus*: Comparative sequence analysis of capillovirus genomes. **J. Gen. Virol.** v.76, p.2305-2309, 1995.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; COUTO, M.; FRANCESCATTO, P. Avanço na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.Especial, p. 48-56, 2011.

QUAN, J.; TIAN, J. Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways. **PLoS ONE**, v.4, 2009. 6641p.

ROTT, M. E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaption of an alternative cloning method (DOPPCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant pathology* 107:411-420. 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D. W. The condensed protocols from molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001.

SANGER F.; COULSON A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94 (3): 441–8.1975.

SATOH, H.; YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T. Construction and Biolistic Inoculation of an Infectious cDNA Clone of Apple Chlorotic Leaf Spot Trichovirus. **Ann.Phytopathol.Soc.Jpn.** v.65, p.301-304, 1999.

SAWAMURA K.; OSADA S. Apple stem grooving virus isolated from apple cv. Starkrimson Delicious. **Bulletin of the Faculty of Agriculture** Hirosaki University. v.33, p.19-27, 1980.

SHAMOUL, M.; TRUSA, J.; METT, V.; YUSIBOV, V. Optimization and utilization of Agrobacterium-mediated transiente protein production in Nicotiana. **J. Vis.** v.86, p.1-13, 2014.

SHETTY, P. R.; DREW, E.N.D.Y.; THOMAS, F.; KNIGHT, J.R.J. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **Biol Eng.** p.2-5, 2008.

SIEBERT, Z. V; ENGELBRECHT, D. J. Field and glasshouse evaluation of *Pyronia veitchii* as an indicator of some apple latent viruses *Phytophylactica* Vol. 13 No. 4 pp. 199-204. 1981.

SZITTYA, G.; SILHAVY, D. A.; ÂR, A. M.; HAVELDA Z. H.; LOVAS, A. A.; LAKATOS, L. A.; ÂNFALVI BURGIA J. A. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal* Vol.22 No.3 p.633±640, 2003

TAKAHASHI, T., SAITO, N., GOTO, M., KAWAI, A., NAMBA, S., YAMASHITA, S. *Apple stem grooving virus* isolated from Japanese apricot (*Prunus mume*) imported from China. *Res. Bull. Plant Prot. Ser. Jpn.* v.26, p.15-21, 1990.

TANG J.; OLSON J.D.; OCHOA-CORONA F.M.; CLOVER G.R.G.; *Nandina domestica*, a new host of *Apple stem grooving virus* and *Alternanthera mosaic virus*. **Australasian Plant Disease Notes**, v.5, p.25-27, 2010.

TATINENI, S., AFUNIAN, M.R., GOWDA, S., HILF, M.E., BAR-JOSEPH, M., DAWSON, W.O. Characterization of the 5'- and 3'-terminal subgenomic RNAs produced by a capillovirus: evidence for a CP subgenomic RNA. **Virology**, v.385, p.521–528, 2009.

TERAUCHI, H., MAGOME, H.; YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T.; INOUYE, N. Contruction of an Infectious cDNA Clone of the Apple Stem Grooving Capillovirus (Isolate Li-23) Genome Containing a Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA Promoter. **Ann.Phytopathol.Soc.Jpn.** v.63, p.432-436, 1997.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v.22, p.4673-4680, 1994.

UNTERGASSER A., HARM NIJVEEN, XIANGYU RAO, TON BISSELING, RENÉ GEURTS, JACK A.M. Leunissen: Primer Plus, an enhanced web interface to Primer Nucleic Acids. **Research**, v.35, p.71-74, 2007.

UNTIVEROS, M.; FUENTES, S.; SALAZAR, L. F. Synergistic interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) and carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato. **Plant Disease**, v.91, p.669-676, 2007.

VAN DER MEER, F. A. PLANT SPECIES OUTSIDE THE GENUS MALUS AS INDICATORS FOR LATENT VIRUSES OF APPLE ISHS Acta Horticulturae 44: IX International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. 1975

WU Y. Q.; ZHANG D. M.; CHEN S. Y.; WANG X. F.; WANG W. H. Comparison of three ELISA methods for the detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus. **Acta Hort.** v.472, p.55-59, 1998.

YANG, S.J.; REVERS, F.; SOUCHE, S.; LOT, H.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; DUNEZ, J. Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. **Arch Virol.** v.143, p.2443-2451, 1998.

YOSHIKAWA, N., IMAIZUMI, M., TAKAHASHI, T., INOUE, N. Striking similarities between the nucleotide-sequence and genome organization of citrus tatter leaf and apple stem grooving capilloviruses. **J. Gen. Virol.** v.74, p.2743-2747, 1993.

YOSHIKAWA, N., SASAMOTO, K., SAKURADA, M., TAKAHASHI, T., YANASE, H. Apple stem grooving and citrus tatter leaf capilloviruses obtained from a single shoot of Japanese Pear (*Pyrus serotina*). **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.** v.62, p.119-124, 1996.

YOSHIKAWA, N.; SASAKI, E.; KATO, M.; TAKAHAS, T. The nucleotide sequence of apple stem grooving capillovirus genome. **Virology**, v.191, p.98-105, 1992.

YOUSSEF, F., MARAIS, A.; FAURE, C.; GENTIT, P.; CANDRESSE, T.. Strategies to facilitate the development of uncloned or cloned infectious full-length viral cDNAs: Apple chlorotic leaf spot virus as a case study. **Virology Journal** p.8:488, 2011.

ZHANG, Y.; WERLING, V.; EDELMANN V. Slice: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method *Nucleic Acids Res.* v.40, n.8, 2012, 55p.

ZHAO L.; HAO X.; LIU P.; WU Y. Complete sequence of an Apple stem grooving virus (ASGV) isolate from China. **Virus Genes**, v.45, p.596–599, 2012.

ZHONG-BIN W.; HSIN-MEI K.; YUH-KUN C.; FUH-JYH J. Biological and Molecular Characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* Causing Chlorotic Leaf Spot on Pear (*Pyrus pyrifolia*) in Taiwan. **Hortscience**, v.45, n.7, p.1073–1078, 2010.

6 Anexos

Sequência completa de nucleotídeos do isolado M219-3 de *Apple stem grooving virus*

M219-3 Brasil

```
1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
AAATTTAACAGGCTTAATTTCCGCGCTTTACGTCAATGGCTTTCACTTAC
AGAAACCCCTCTAGAAGTTGCAATTAACAAACTTGCCAGCAAGCAGTCTGA
TCAACTGCCTTCTTTGACTACCGACGAGATTGAAAAGACCTTAGAAGTGA
CTAACCGCTTCTCTCTTTTTCAATCACACCAGAAGATCAAGAAATGTTG
ACCAAGCATGGTTTGACACTTGACCTATAGGGTTCAAATCACACTCCCA
CCCAATATCCAAGATGATAGAAAATCATCTCTTGTACATATGTGTTCCAA
GTCTTCTGTCTTCTCAAGTCAGTTGCCTTTTTTTCACTTAGAGAGAGT
AAAGTAAATAGCTTTCTCAAGATGCACTCAGTCTTTTCTCACGGAAGAAT
CAAATCTTTAGGGATGTACAACGCTATAATTGATGGGAAAGACAAATATA
GGTATGGTAATGTAGAGTTTTTCATCCTTTAGGGATAGAGTGATTGGTCTT
AGAGATCAATGCCTCACACGTAATAAATTTCCAAAAGTTCTGTTTCTTCA
CGACGAGTTGCATTTTCTAAGTCCATTTGACATGGCTTTTCTATTTGAGA
CAATCCCAGAAATTGATAGAGTTGTTGCAACCACAGTTTTTCCGATAGAA
CTTTTATTTGGGGACAAGGTCTCTAAGGAACCCAGGGTTTATACCTACAA
GGTCCATGGCTCTTCATTTTTTCAATTTTATCCGGATGGCGTTGCCTCTGAGT
GTTACGAACAGAAATTTGGCAAATTTCTAAATGGCCCTTACCTGCAGTGGC
ATACAATGGGCTAACAGGAAAATTAGGGTAACCAAGCTACAGAGTCTCTT
CGCCCATCATGTTTTCTCATTTGACAGAGGGAGGGCTTGCAATGAATTCA
ATCATTTTCGACAAAACCTAGCTGTCTACTTGCAGGAAAGAAATGCGCCTTTG
ACCAAAAGGTTTGATAAAGCAGTTATTAACAGAAGCACAGTCTCTCCCT
CAGTACATACATGGCTTGTCTTAAACTGCAAATGCGGCTTCAGCTGTTG
CCAAGCTGAGGCAGTTGGAGAAGAGGGACCTTTACCCAGATGAGTTGAAC
TTCTGTCTATTCCTTTGGAGAGCATTTCAAAAATTTGGGATGAGAGATGA
CTTTGATGTGTCAATTTTACAATGGGTCAAAGACAAATTTTGCCAGGTCA
TGCCCCACTTTCATCGCCGCCAGTTTTTTTTGAACCAACAGAGTTTCATTTA
AACATGCGCAAATTTGTTGAATGATCTGGCTACTAAAGGAATAGAGGTCCC
CCTTTCTGTGATCATCCTGGACAAAGTCAACTTCATAGAGACCAGATTTT
ATGCCAGGATGTTTCGACATAGCACAGGCAATCGGGGTGAATCTAGATTTA
CTGGGGAAAAGATTTGATTATGAAGCTGAGAGTGAAGAATACTTTTCAGA
GAACGGTTACATCTTTATGCCCTCTAAATCAAATCCAGAGAGAAAATGGGA
TTCTAAATTCGTTTCGCTGAAAATGACTATTCAAGATTGGTGAGAGCC
AGGAGATTTAGATTAAGAAGAGATTTCTTAGATCCCATATCTAAAGGAAA
ATCCCCTAGAAAACAACTCTTCTTGGAGTCAATGGGAAACATTAATCAA
ATCCCAATGCTGAAAAGGTAGCGAGAGTGGCGAAATAAAGGTTGAAGGC
AGTGCCGAAAATGACCAGCCACATGAAGTATCACATACTTCAATGGAAC
CGAGGATGGACAGGGTTTTGAAGGTTCAATACCAGTTGATTTGATCAATT
GCTTTGAACCAGAAGAAATCAAGCTCCCAAAGAGAAGAAGGAAAATGAT
TGCGTCTTCAAGGCCATCTCTGCACACTTGGGGATTGACTCTCAAGATTT
GTTGAATTTTTTGGTAAATGAAGACATATCAGATGAATTACTTGATTGCA
TCGAAGAGGACAAAGGACTGTCACATGAAATGATTGAAGAAGTTTTGATA
ACAAAGGGTCTTTCAATGGTTTATACTTCTGACTTCAAAGAAATGGCAGT
TCTTAATAGAAAATGATGGAGTGAATGGCAAGATGTACTGCACAATTAAG
GCAATCACTGCGAGCTGAGTTCCAAAGAGTGCTTCATCAGATTGTTGAAA
GAAGGTGGTGAAGCACAGATGTCAAATGAAAATCTAAATGCTGATTCCTT
GTTTCGACCTTGGAAGATTTGTGCATAACAGAGACAGAGCTGTCAAGCTAG
CAAAATCCATGGCAAGAGGCACAACAGGCCTCTGAACGAATTCGACCTA
GAATTTTGAAGAACATGGTGACCCTTTCAGAGTTGTTTCTGAAAACCTT
TTCTTCTGTTGTGCGGCTAAGGCTTGGGTTTGCAGGTTCTGGTAAAACGC
```

ATAAGGTGCTTCAATGGATTAATTACACTCCAAGTGTTAAAAGAATGTTT
ATAAGTCCAAGGAGAATGCTGGCGGATGAAGTTGAACCTCAACTCAAAGG
AACGGCCTGTCAAGTGCATACATGGGAGACCGCACTCAAAAAATCGACG
GAACTTTTATGGAAGTTTTTGTGATGAGATAGGTTTTGTACCCACCTGGA
TACCTTACACTATTGCAGATGTGCGCTTTCAGAAAAGATTGTTAAGGGGCA
AAGTGAATAATTTCTTGAAAGGCAAACCTGTTGGCATTGTCAAAGACTTGCC
TAAACATAAGATGTTTTGGTGATCCATTGCAATTAAGGTATTACTCAGCT
GAAGACACCAATCTATTAGACAAAACACATGATATTGACCTCATGATCAA
GACAATCAAGCACAATATCTTTTTCAAGGTACAGGTTCCGGTCAGTGGT
TTCAAGAATTTGGTGAACATGCCCACTAGAGTAGATGAGTCGAAATTTCTCA
AGGAAGTTCTTTCAGACATTTCAAGTGTAAAACTGAAGATTACGGACT
CATCCTAGTTGCCAAGAGAGAAGATAAAGGTGTTTTCGCTGGAAGAGTTC
CTGTAGCAACAGTGAATCTCAGGGGATGACTATTAGCAAAAAGGGTG
TTGATATGTTTTGGACCAGAATCTTTTTGCCGGGGGAGCCAATGCAGCCAT
TGTTGCAATAACAAGATCAAAGGTCGGCTTTGACTTCATCCTTAAAGGGA
ATTCATTGAAAGAGGTACAGAGGATGGCACAAGACAATTTGGCAGTTC
ATCATTGAAGGAAAGTCTATTCCGATGGAGAGGATAGTGAATATGAATCC
TGGAGCTAGCTTTTATGAGAGTCCTTTGGATGTTGGAAATTCATCAATTC
AAGACAAAGCTTCTCATGACCTATTCATAATGCCTTTTATAAATTTGGCT
GAGGAAGAAGTTGACCCGGAGGAAGTTGCTGGGGACGTAATTCACCTGT
TGAGTGGTTCAAATGTCATGTACCTGTCTTCGACACAGATCCAATGCTTG
CGGAGATTTTTGATAAGGTTGCGGCAAAAGAAAAAGGGAATTCAGTCT
GTACTGGGTCTTCAAATCAATTTCTTGACATGGAAAAGAATGGATGCAG
GATAGACATCTTGCCCTTTGCGCGACAAAATGTTTTTCCACATCATCAAG
CGTCTGATGATGTTACTTTCTGGGCAGGTGTTTCAGAAAAGAATCAGAAAA
TCGAACTGGAGAAGGGAGAAGTCAAAATTTGAGGAATTTGAAAGCCAAGG
AAAAGAACTTCTTCAAGAATTCATCTCAATGCTGCCGTTTGAATTTAAGG
TGAATATCAAGGATATTGAAGATGGAGAGAAGAGCTTTTTAGAAAAAGA
AAGCTAAAATCTGAGAAAATGTGGGCAAATCATTTCGAGAGATCAGACAT
TGACTGGAACCTTGACCACGCCTTTCTCTCATGAAATCACAATATTGCA
CGAAGGAAGGAAAGATGTTACCGAGGCTAAAGCTGGCCAAACTTTGGCT
TGCTTCCAACACATAGTCCTATTTAGATTTGGACCCATGTTGAGAGCAAT
TGAAAGTGCTTTCTTGAGGAGTTGTGGGGAATCATATTACATACATCCG
GAAAGAACTTTTTCTGCCTAGACAGTTTTGTAACAAAGAATGCAAGTGNN
TTTTGACGGATTTTCCATTGAATCTGACTACACGGCTTTTGACTCGTCCCA
AGACCAGTGATTTCTAGCATTGAAATGGCACTGCTTCAGTATCTGGGTG
TGTCAAAGGAATTCAGCTAGACTACTTGAGGTTAAAGCTAACGCTCGGG
TGCAGACTCGGGTCACTGGCAATCATGAGGTTCACTGGAGAATTTGCAC
CTTCTTGTTCAATACATTTGCAAACATGCTCTTCAACCAGTTGAAGTACA
AAATTGACCCCAGGAAACATAGGATTCGTTCGCTGGAGACGACATGTGC
TCTTTGAGCTCTCTCAAAGGAGGAGAGGTGAGAGAGCAACGAGACTAAT
GAAGAGCTTCTCTAACTGCTGTGCGAGGAAGTCAGGAAGTCCCCATGT
TTTTGTGGGTGGTACTTGAGCCCCATGGAATCATCAAATCTCCAAACTG
CTGTGGGCAAGAATTAAGATGATGAGTGAGAGACAGCTCCTAAAGGAGTG
GGTTGATAACTACCTATTGAGGCAATCTTTGCCTACAGATTAGGTGAGA
TGCTCTACACAACTTTGAAAGAAGAGGACTTCGAATATCACTATCTTGTT
ATTAGATTTTTCGTTAAGAACTCAAAGTTGCTCACTGGTCTTAGCAAAAAG
TCTAATCTTTGAAATTTGGTGAAGGAATCGGGTCTAAATGGCAATCGTCAA
CGTCAATCACTTCTCAAGGAGGTCGAGTCAACTGACCTCAAGATTGATG
CGATCTCTTCTCTGAGCTTTACAAAGATGCAACTTTCTTCAAGCCAGAT
GTGCTCAACTGTATCAAAGATTTGAGTCAAATGTCAAAGTCTCGTCAAG
GTCTGGAGACGGCTTTGGTGTCTGACTTCAAACACTTGTGATGATACCG
AAATTGACTCGATTTCGAAAAAGAGTAAACAAGTACAAGTACTTGCACTAC
GGAGTCACTAGTTGGAATCAAAGCTATGCTGCCAAATTTTAGGGGAAT
GGAAGGAAGAGTCATTATATATGATGGGCGCTGTTTTGGACCCAGAAAGG
GCCATATCTGTTCAATTTGTTCAAGTTTGAGTCTGATTGCTGTTACTTT
GGACTCAGACCTGAACATTGTCTTTCAACAACGGACGCCAACCTGGCAAA
GAGGTTCAAGTTTCGGGTGGATTTTACTGTCCACAATATGAGCAAGACA
CAGAACTGTTCCNCCTTGACATTGGGGTTGCTTATAGATGTGTCAATTCA
GCAAGGTTCTTGAACCAAGACTGGTGAATTCAGGGTGGGCCTCACAGGC
AATCAGTGGATGTGAGGCACTTAAATTTAATGAAGAAATCAAATGGCCA

TTCTGGATCACAAATCTCCACTGTTTCTGGAGGAAGGTGCACCAAATGTG
CACATTGAGAAAAGACTGTTTAGAGGTGACAAAATTAGGCGATCACGCTC
TATTTAGCAAAAGAGGGGGCCAAACTCNNGGAGCCAAGGAAAGAGAGGAT
TTAGGTCCCTCTCAGCAAGAATCGAAAGATTTGGAGAACATGAGTTTGA
AGACGTGCTTCAACTAGCGAGGCGCCACCGGGTAGGAGTGTATCTGTGGA
AGACCCACATAGACCCGGGAAAGGAAATTTCTGACGGTTCTCCCCCTGAA
AGCTTCAAAGAAGGTGAAAGCTTCGAAGGCAGAGAGCTTTACCTTCTTCT
CTGCAACCATTACTGTAAATACTTNTTCGGTAATATTGCTGTTTTCGGGT
CCTCTGACAAGACCAGTTTTCCCGCTGTGGATTGATACCCCTCCGGTT
CATTACAATCTGACAACAACCCCAAGAGAAGGGGAAACGGAAGAACAAAA
GAAGGCCAGAGAGGGGACGTCTGGCGAAAAACAAAAGTTTGGAGGATCG
ACCTGTCAAACGTTGTGCCTGAACTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCAAGG
CAGAACTCTCTGAACGAATGTACGTTCCGAAAGCTTTGTGAGCCATTTGC
TGATCTGGCTCGTGAATTTCTACATGAAAGGTGGTCCAAGGGATTGGCCA
CTAATATATATAAGAAATGGCCCAAAGCTTTTGAGAAAAGCCCGTGGGTG
GCATTTGACTTTGCCACTGGTCTAAAAATGAACAAATTGACACCTGATGA
AAAACAGGTGATGATAGAATGACCAAACGGCTTTTTTCGTACTGAAGGC
AGAAAGGGGTTTTCGAAGCAGGCTCGGAGAGTAACTTGAACCTGGAGGGT
TAGAAGTCGTATCAAATTCGCAAACCTGGTTCGCGGTCTTGCAGGTTGAC
ATGCCTGCCTTTATACGTAATAAAGGGTTCACCCGGTTTTCTGAGCATT
TCCGGGTTAGTGTGGTTTTTCTAGAGTCTAGAGTTTGTCCACTCT

Sequência completa de nucleotídeos do isolado M220 de *Apple stem grooving virus*

M220 Brasil

```

1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
AAATTTAACAGGCTTAATTTCCGCGCTTTACGTCAATGGCTTTCACTTAC
AGAAACCCCTCTAGAAATTGCAATCAACAACTTCCCAGCAAGCAATCTGA
TCAATTGCTTGCATTAACCACAGACGAGATTGAAAAGACCCTAGAAGTGA
CCAATCGCTTCTTTCTTTTTCAATAACCCAGAAAGATCAAGAACTGTTA
ACCAAGCATGGGTAAACACTTGCACCCATCGGATTCAAATCGCACTCTCA
TCCTATTTCTAAGATGATAGAAAATCATCTTCTGTACATATGCATTCCAA
GCCTTTTGTCTCCTTCAAATCAGTTGCTTTTTTTTTCACTTAGAGAAAAT
AAAATGAACAGTTTTCTCAAATGCATTCGGTTTTTTTCCCATGGAAAAT
AAAGTCTCTAGGTATGTACAATGCCATCATGATGGGAAAGACAAATTTA
GATATGGGGACGTCAGTTCTCTTCTTTTAGAGATAGAGTGATTGGTCTT
AGAGATCAATGCCTCACACGTAATAAATTTCCAAAAGTTCTGTTCTTCA
CGACGAGTTGCATTTCTTAAGTCCATTTGACATGGCTTTCCTATTTGAGA
CAATCCAGAAATTTGATAGAGTTGTTGCAACCACAGTTTTTCCGATAGAA
CTTTTTATTTGGGGACAAGGTCTCTAAGGAACCCAGGGTTTTATACCTACAA
GGTCCATGGCTCTTCATTTTCATTTTATCCGGATGGCGTTGCCTCTGAGT
GTTACGAACAGAATTTGGCAAATTTCTAAATGGCCCTTCACCTGCAGTGGC
ATACAATGGGCTAACAGGAAAATTAGGGTAACCAAGCTACAGAGTCTCTT
CGCCCATCATGTTTTCTCATTTGACAGAGGGAGGGCTTGCAATGAATTCA
ATCATTTTCGACAAACCTAGCTGTCTACTTGCAGGAAAGAAATGCGCCTTTG
ACCAAAGGTTTGATAAAGCAGTTATTAACAGAAGCACAGTCTCTCCCT
CAGTACATACATGGCTTGTCTTAAACTGCAAATGCGGCTTCAGCTGTG
CCAAGCTGAGGCAGTTGGAGAAGAGGGACCTTACCCAGATGAGTTGAAC
TTCGTCTATTCTTTGGAGAGCATTTCAAAAATTTTGGGATGAGAGATGA
CTTTGATGTGCAATTTTACAATGGGTCAAAGACAAATTTTGCCAGGTCA
TGCCCCACTTCAATCGCTGCCAGTTTTTTTTGAACCAACAGAATTTCAATTA
AACATGCGCAAAATTTGTTGAATGATCTGGCTACTAAAGGGATAGAGGTTCC
CCTTTCTGTGATCATCCTGGACAAAGTCAACTTCATAGAGACCAGATTCC
ATGCCAGGATGTTTCGACATAGCGCAGGCAATCGGGGTGAACCTAGATTG
CTGGGGAAAAGATTTGATTATGAAGCTGAGAGTGAAGAATACTTTTCAGA
GAACGGTTACATCTTTATGCCCTCTAAATCAAATCCAGAGAGAAAATGGA
TTCTAAATTTCTGGTTCGCTGAAAATTTGACTATTCAAGATTGGTGAGAGCC
AGGAGATTTAGATTAAGAAGAGATTTCTTAGATCCCATATCTAAAGGAAA
ATCCCCTAGAAAACAACCTCTTCTTGGAGTCAATGGGAAACATTTAAATCAA
ATCCCAATGCTGAAAAGGTAGCGAGAGTGGCGAAATAAAGGTTGAAGGC
AGTGCCGAAAATGACCAGCCACATGAAGTATCACATACTTCAATGGAAAC
CGAGGATGGACAGGTTTTTGAAGGTTCAATACCAGTTGATTTGATCAATT
GCTTTGAACCAGAAGAAAATCAAGCTCCCAAAGAGAAGAAGGAAAAATGAT
TGCGTCTTCAAGGCATCTCTGCACACTTGGGGATTGACTCTCAAGATTT
GTTGAATTTTTTGGTAAATGAAGACATATCAGATGAATTGCTTGATTGCA
TTGAAGAGGACAAAGGACTGTCACATGAAATGATTGAAGAAGTTTTGATC
ACAAAGGGTCTTTCAATGGTTTTATACTTCTGACTTCAAAGAAATGGCAGT
TCTTAATAGGAAGTATGGAGTGAATGGCAAGATGTACTGCACAATTAAG
GCAATCACTGCGAGCTGAGTTCCAAAGAGTGCTTCATCAGATTATTGAAA
GAAGGTGGTGAAGCGCAGATGTCAAATGAAAATCTAAATGCTGATTCCTT
GTTTCGACCTTGGAAAGATTTGTGCATAATAGAGACAGAGCTGTCAAGCTAG
CAAAATCCATGGCAAGAGGTACAACAGGCCTCCTGAACGAATTCGACCTA
GAATTCGCAAAAACATGGTAACCCTTTTCAGAAATGTTTTCTGAAAACCTT
TTCTTCTGTTGTCGGGCTAAGGCTTGGGTTTGCAGGTTCTGGTAAAACGC
ATAAGGTGCTTCAATGGATTAATTACACTCCAAGTGTTAAAAGAATGTTT
ATAAGTCCAAGAAGAATGCTAGCGGATGAAGTTGAACCTCAACTCAAAGG
AACGGCCTGTCAGGTGCATACATGGGAGACCGCACTTAAAAAATCGACG
GAACTTTTATGGAAGTTTTTTGTTGATGAGATAGGTTTTGTACCCACCTGGA
TACCTTACACTGCTACAGATGTGTGCTTTCAGAAAAGATTGTTAAGGGACA

```

AAGTGA AAAATTTCTTGAAAGGCAAAC TGTGGAATTGTCAAAGACTTGCC
TAAACATAAGATGTTTTGGTGATCCATTGCATTTAAGGTATTACTCAGCT
GAAGACACCGATCTATTGGACAAAACACATGATATTGACCTCATGATCAA
GACGATCAAGCACA AATATCTTTTTCAAGGGTACAGGTTTGGTCAGTGGT
TTCAAGAACTGGTGAATATGCCAAC CAGAGTAGATGAGTCGAAAATCTCA
AGGAAGTTCTTTGCAGACATTTCAAGTGTAAAAACTGAAGATTACGGACT
CATCCTAGTTGCCAAGAGAGAAGATAAAGGTGTTTTCGCTGGAAGAGTTC
CTGTAGCAACAGTGAGTGAATCTCAGGGAATGACCATTAGCAAAAAGGGTG
TTGATATGTTTTGGACAAAATCTTTTTGCCGGGGGAGCCAATGCAGCCAT
TGTTGCAATAACAAGATCAAAGGTCGGCTTTGACTTTATCCTTAAAGGGA
ATTTCATTGAAAGAGGTACAGAGGATGGCACAAAAGACAATTTGGCAGTTC
ATCATTGAAGGGAAGTCTATTCCGATGGAGAGGATAGTGAACATGAATCC
TGGAGCCAGCTTTTATGAGAGTCC TTTGGATGTTGGAAATTCATCGATT
AAGACAAAGCTTCTCATGACCTGTTCAATAATGCCTTTTATAAATTTGGCT
GAGGAAGAAGTTGATCCGGAGGAAGTGTGGGGACGTAATCAACCTGT
TAAGTGGTTCAAATGTCATGTGCCTGTCTTCGACACAGATCCAATGCTTG
CAGAGATTTTTGATAAGGTTGCAGCAAAAAGAAAAAGGGAATTCAGTCT
GTATTGGGTCTTTCAAATCAATTCCTTGACATGGAAAAGAATGGATGCAA
GATAGACATCTTGCCCTTTGCGCGACAAAATGTTTTTCCACATCATCAAG
CGTCTGATGATGTTACTTTCTGGGCAGGTGTTCAAAAAGAATCAGAAAAG
TCGAACTGGAGAAGGAGAAAATCAAAGTTTGAGGAATTTGAAAGCCAAGG
GAAAGAACTTCTCAAGAATTTATCTCAATGCTACCGTTTGAATTC AAGG
TGAATATCAAGGATATTGAAGATGGAGAGAAGAGCTTTTTAGAGAAAAGGA
AAGCTAAAATCTGAGAAAATGTGGGCAAATCATTCCGAGAGATCAGACAT
TGACTGGAAACTTGACCACGCCTTTCTCTCATGAAATCACAATATTGCA
CGAAGGAAGGGAAGATGTTACCGAAGCTAAAGCTGGCCAAACTTTGGCC
TGCTTTCAACACATAGTCCTATTTAGATTTGGACCCATGTTGAGAGCAAT
TGAAAGTGCCTTTTTGAGAAGCTGTGGAGACTCATACTACATACTCCG
GGAAAACTTCTTCTGCCTGGATAGCTTTGTGACAAAAGAATGCAAATGTC
TTTTGATGGATTTTCAATTGAGTCAGACTACACGCCTTTGACTCATCTCA
GGACCACGTCATATTGGCCTTTGAAATGGCACTATTACAATACCTGGGCG
TGTCAAAAGAGTTTCAGCTAGATTACCTTAGACTGAAATTAACCTCGGA
TGCCGTCCTCGGATCACTGGCAATAATGAGGTTACACAGGAGAATTTGCAC
TTTTCTTATTCACACATTTGCCAACATGCTGTTACTCAATTGAAGTACA
AGATAGACCC AAGGAGGCATAGGATTTTATTTGCTGGGGACGATATGTGT
TCCTTGAGCTCTCTCAAAGAAGGAGAGGGGAGAGAGCGACAAGATTGAT
GAAGAGCTTTTCCCTAACTGCAGTAGAAGAGGTGAGAAAATTTCCAATGT
TTTTGTGGATGGTACTTAAGTCCATACGGTATCATCAAATCTCCAAAATTG
TTGTGGGCCAGGATCAAGATGATGAGTGAGAGACAGCTTTTTGAAGGAATG
TGTTGATAATTACCTGTTTGAGGCAATATTTGCCTACAGATTAGGTGAGA
GGCTTTACACAATTTTGAAAGAAGAGGATTTGAATACCATTATCTTGTC
ATAAGATTTTTTGTTAGAAAATTCAAAATGTTAACAGGGTTGAGCAAAAAG
CTTGATATTTGAAATTTGGGGAGGGCATCGGGTCCAAATGGCTATCGTCAA
CGTCAACCGCTTCTCAAGGAGGTCGAATCTACAGACCTCAAAAATTGATG
CTATCTCGTCTCAGAGCTTTACAAGGATGCAACCTTTTTCAAACCAGAC
GTGCTTAAATGTCATCAAAGATTTGAATCAAATGTCAAGGTTTCTCTCG
ATCTGGTGACGGCTCGTCTGTCTGATTTCAAAC TGTGATGACACCG
AAATTGATTCATCAGGAAGAAGAGCAACAAGTACAAATATTTGCATTAT
GGAGTCATCCTGGTTGGGATCAAAGCAATGTTGCCAAACTTTAGAGGCAT
GGAAGGGAGAGTCATTGTATATGATGGAGCCTGCCTGGATCCGGAAAGAG
GCCACATTTGCAGTATCTTTTTCAAGTTTGAGTCTGACTGTTGCTACTTT
GGTCTCAGGCCAGAGCACTGTTTGTCTACTACAGACGCAAACCTTGCCAAA
AAGGTTTAGATTTTCGTGGACTTTGATTGTCCACAATATGAACAAGACA
CTGAGTTGTTTTGCCCTTGACATTTGGAGTTGCATACAGATGCGTCAACTCT
GCAAGGTTTTTTGAAAACCAAACAGGGCATT CAGGGTGGGCTTCACAGGC
AATCAGCGGCTGTGAAGCACTTAAATTC AATGAGGAAATCAAGATGGCCA
TCCTGGATCGCAAAATCCCCGCTGTTTCTGGAAGAAGGTGCACCAAACGTG
CATATTGAAAAGAGACTGTTTCAGAGGTGACAAGGTTAGAAGGTCACGCTC
AATTTCCGCTAAAAGGGGGCCAAACTCAAGGGTGAAGAAAAGAGAGGAT
TTAGGTCCCTCTCGGCTAGAATTGAAAGATTTGGAAAAAATGAGTTTGGGA
AGACGTGCTTCAACAAGCGAGACGCCACCGGGTAGGAGTATATCTATGGA

AGACTCACATAGACCCGGCAAAGGAACTTCTGACGGTTCCCTCCCCCTGAA
GGATTTAAGGAAGGTGAAAGCTTTGAGAGCAAAGAGCTTTACCTTCTTCT
TTGCAACCATTACTGTAAATACTTGTGGTAATATTGCTGTCTTTGGGT
CATCTGATAAGACCCAGTTTCCCGCTGTTGGATTTGATACACCTCCGGTT
CATTACAATTTGACAACGACCCCAAAGGAGGGGAGACTGACGAAGAAAG
GAAGGCCAGAGCGGGTTTCGTCTGGCGAAAAAACAAAAATTTGGAGGATCG
ACTTGTCAAATGTTGTTCCCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGG
CAGAACTCTTTGAACGAATGTACGTTTCAAGAAAGCTTTGCGAGCCATTTGC
CGATTTGGCTCGAGAATTTCTGCATGAAAGGTGGTCCAAGGGATTGGCCA
CCAATATTTACAAGAAATGGCCCAAAGCTTTTCGAAAAAGTCCATGGGTG
GCCTTTGATTTTGCCACTGGTCTGAAAATGAATCGTCTAACACCTGATGA
GAAACAGGTGATTGATAGAATGACCAAAAAGACTTTTTTCGTACTGAAGGAC
AAAAAGGGGTTTTTCGAGGCAGGTTTCAGAAATGTCACCTGGAAGTGGAGGGT
TAGGAGTCGTGTGAAATTCGCAAACCTGGTTCGCGGTCTTGCAGGTTGAC
ATGCCTGCCTTTATACTTAATTAAGGGTCCCCCGGTTTTCTGAGCATT
TCCGGGTTAGTGTGGTTTTTCTAGAGTCTAGAGTTTGTCCACTCT

Reagentes e equipamentos utilizados

Vetores:

pGEMTeasy® Promega pGEMT® Promega

pV 297 Prof. Dr. E. Maiss

Marcador de peso molecular:

Gene Ruler 1kb DNA ladder Thermo Scientific Fischer Page Ruler

Kits de reações:

QIAprep® Spin Miniprep Kit QIAGEN

QIAquick® Gel Extraction Kit QIAGEN

QIAquick® PCR Purification Kit QIAGEN

RNeasy® Plant Mini Kit QIAGEN

Cepas bacterianas:

Escherichia coli 5 alfa

E. coli 10 beta NEB

Agrobacterium tumefaciens ATHV rifR Hood et al. 1986

Enzimas:

Endonuclease de restrição (Promega)

DNase 1 u/μl Promega

DNA Ligase 30 u/μl Thermo Scientific Fischer

Ribolock™ RNase Inhibitor* 40 u/μl Thermo Scientific Fischer

Precisor High-Fidelity DNA Polymerase 2 u/μl BioCat RevertAid™

Reverse Transcriptase 200 u/μl Thermo Scientific Fischer

RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase 200 u/μl Buffer Thermo Scientific Fischer

AMV Reverse Transcriptase 10 u/μl Promega

Nucleotídeo:

dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 100 mM Thermo Scientific Fischer NTPs

(ATP, UTP, CTP, GTP) 100 mM Thermo Scientific Fischer

Equipamentos:

Incubadoras: 3033 (GFL); Innova TM4430 incubadora shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc.); Certomat® (B. Braun Biotech international)

Fonte para Eletroforese Mighty Small II SE 250 Amersham

Eletroporador Pulse Controller Gene Pulser™ BIORAD BIORAD

Centrífuga refrigerada com arrefecimento e rotores de ângulo fixo J2- 21 Avanti

J- 26 XP JA- 14; JA- 20 Beckmann Coulter Beckmann

Agitador magnético IKAMAG® RCT Janke & Kunkel

Termociclador PCR- Cycler Mastercycler Eppendorf

Pipetas 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Gilson); 3 µl, 50 µl (Biohit) 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Abimed)

Termo bloco e Termo mixer comfort ThermoStat plus Eppendorf Eppendorf

Centrífuga 5804 Heraeus

Foto documentador: Reprostar 3 E.A.S.Y 429K CAMAG Herolab

Bomba de vácuo: B721

Programas:

LaserGene 7.1 (DNASStar Inc. Madison, EUA)

Mega 4 (TAMURA et al.; 2007)

Outros:

Carborundum Schleifmittelwerke, Dusseldorf

Embalagens para extrações Bioreba Rotilabo®

Filtro de seringa estéril de 0,22 µm Roth

Membrana Millipore VSWP 0,025 microns FC 11 Celulose

Partículas de sílica Amersham Sigma (S5631)

Soluções

0.01M tampão fosfato, pH 7.0

49 ml de solução de 1.362 g KH_2PO_4 dissolvido em 1 litro de água deionizada

51 ml de solução de 1.781 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 1 litro de água deionizada

Meio LB (pH 7,0)

10 g Triptona

5 g Extrato de levedura

10 g NaCl

1 litro de água deionizada

Meio YEB (pH 7,4)

5 g Extrato de carne

5 g Triptona

1 g Extrato de levedura

5 g sacarose

1 litro de água deionizada

LB- AMP- XGal- IPTG

Meio LB (pH 7,0)

1:1000 Ampicillina (100 mg/ml)

1:500 X- Gal (20 mg/ml)

1:1000 IPTG (1 M)

YEB + MgSO₄ + Rif + Kan

Meio YEB (pH 7,4)

1:500 1 M MgSO₄

1:4000 Rifampicina (100 mg/ml)

1:2000 Canamicina (100 mg/ml)

Meio SOC (pH 7,0)

20 g Triptona

5 g Extrato de levedura

0,5 g NaCl

10 ml 250 mM KCl

5 ml 2 M MgCl₂

20 ml 1 M Glucose

1 litro de água deionizada