



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENOMA
COMPLETO DO *POTYVIRUS Brugmansia
suaveolens mottle virus***

Natália Lucinda

**Brasília
2010**

NATÁLIA LUCINDA

**DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENOMA COMPLETO DO
*POTYVIRUS Brugmansia suaveolens mottle virus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Fitopatologia.

Orientadora: Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

**Brasília
2010**

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da professora e pesquisadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata e co-orientação do professor e pesquisador Dr. Tatsuya Nagata. Apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora:

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata (Orientadora)
Universidade de Brasília
Embrapa Hortaliças

Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho
Universidade de Brasília

Dr. André Nepomuceno Dusi
Secretaria de Relações Internacionais da Embrapa

Brasília
2010

Dedico à minha família, em especial à minha mãe e ao meu pai, por tudo que são e representam pra mim.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Aos meus pais, Elciane e Luiz, que sempre uniram esforços em prol da minha formação acadêmica e souberam dar força e incentivo nos momentos que mais precisei.

Aos meus irmãos Felipe e Pedro que sempre estiveram do meu lado incentivando-me e apoiando-me.

Ao meu amor Guilherme, que mesmo à distância, esteve ao meu lado tranquilizando e incentivando-me nos momentos de insegurança e medo, acreditando sempre no meu potencial.

Às minhas amigas e prima, que seguramente tenho como irmãs, Thaís, Flávia e Lis, que foram capazes de compreender as minhas ausências, e também pacientes em ouvir todas as lamentações nos momentos de estresse e ansiedade, confortando-me sempre com palavras de incentivo.

À Dra. Alice K. Inoue-Nagata e ao professor Dr. Tatsuya Nagata, pelos ensinamentos, orientação, exemplo de profissionalismo, amizade nos momentos difíceis, conselhos preciosos, incentivos, auxílio e presteza em todos os momentos que precisei. A vocês toda a minha consideração e admiração.

A todos do grupo de pesquisa em Virologia, em especial, as minhas colegas Anna, Layssa, Karoline, Kelly, Adriana, Franciele e Raquel, pelos conselhos, alegrias, companheirismo, e incentivo nos momentos difíceis.

A todos os amigos que conquistei e que me acompanharam durante o mestrado, em especial, Jessica, Mônica, Justino, Daniel, Mikhail, Claudênia, Liamar e Andressa, pela amizade, alegria, força, convívio e muitos trabalhos compartilhados. A vocês meu sincero agradecimento.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos, em especial a professora Rita de Cássia, sempre disponível e prestativa nos momentos em que precisei.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para o êxito deste trabalho, minha sincera gratidão.

E acima de tudo, agradeço a Deus por tudo de especial que tem acontecido em minha vida.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve. E a vida é muito para ser insignificante."

(Augusto Branco)

RESUMO

O vírus *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV) foi isolado da solanácea *Brugmansia suaveolens* (conhecida como trombeteira, saia-branca) da coleção de plantas medicinais do Instituto Agronômico, Campinas-SP, Brasil, sendo o isolado nomeado Bs-Campinas. Um trabalho anterior mostrou que o isolado Bs-Campinas foi transmitido por afídeos, induziu sintomas visíveis em algumas solanáceas e em duas espécies de *Chenopodium* sob condições experimentais, apresentando partículas e inclusões típicas de potyvírus em folhas sintomáticas, quando observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Apenas parte do genoma do vírus era conhecida, uma região compreendendo a extremidade 3', o que o distinguiu suficientemente dos outros vírus para ser classificado como uma espécie nova de potyvírus. O vírus apresenta características distintas de outros potyvírus conhecidos, induzindo uma alta severidade de sintomas em diversas plantas susceptíveis, além da capacidade de infectar o tomateiro, uma cultura de alta importância econômica e social no Brasil. Essas características o tornam um excelente alvo para estudo dos genes relacionados à patogenicidade e para o desenvolvimento futuro de vetores virais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular do isolado Bs-Campinas através da determinação de sua sequência genômica completa e determinar o seu relacionamento filogenético com os diferentes potyvírus já relatados no mundo. Para tanto, procedeu-se o emprego de várias técnicas para o completo resgate do genoma viral e posterior determinação de sua sequência. O RNA total foi extraído e o cDNA sintetizado foi obtido pela técnica de 3' RACE usando primers universais para potyvírus, resultando na amplificação de um fragmento de 8,3kb. A tentativa de clonagem deste fragmento, contudo, resultou em clones que apresentavam uma deleção interna neste fragmento. Dessa forma, o segundo fragmento obtido resultou da amplificação por RT-PCR utilizando-se primers específicos desenhados com base nas sequências das extremidades do fragmento de 8,3kb com o intuito de resgatar a região interna do genoma gerando um fragmento de aproximadamente 4,7kb. Primers específicos foram

também desenhados baseados na sequência da extremidade 5' do clone de 8kb obtido e a estratégia 5' RACE foi usada para amplificar e clonar a extremidade 5' do genoma do vírus, um fragmento de 1,8kb. As amplificações por PCR resultaram no resgate de três fragmentos de cDNA, os quais totalizam a sequência completa do genoma do BsMoV. O RNA genômico consistiu de 9870 nt sem a cauda de poli-A, codificando uma poliproteína típica dos potyvírus de 3090 aa. As análises da sequência de aminoácidos possibilitaram a dedução dos sítios de clivagem, bem como, a identificação das sequências e motivos conservados dentro da sequência de cada proteína, tendo o isolado Bs-Campinas exibido perfil típico de potyvírus. As análises filogenéticas, assim como, comparações com outras espécies de *Potyvirus* do banco de dados online revelaram que esta sequência tem uma identidade nucleotídica de 63,7% com *Pepper mottle virus* (PepMoV), a qual foi a sequência de potyvírus de maior identidade e, portanto, o mais estreitamente relacionado. Uma vez que este valor de identidade é inferior ao limiar (76% de identidade nucleotídica) atualmente usado para discriminar espécies de *Potyvirus*, foi confirmado que *Brugmansia suaveolens mottle virus* representa uma nova espécie dentro do gênero *Potyvirus*.

ABSTRACT

Brugmansia suaveolens mottle virus (BsMoV) was isolated from a *Brugmansia suaveolens* plant (known as "angel trumpet") in the collection of medicinal plants of the Instituto Agronômico, Campinas-SP, Brazil, being the isolate named Bs-Campinas. A previous study showed that the isolate Bs-Campinas was transmitted by aphids and induced visible symptom on some Solanaceous plants and two *Chenopodium* species under the experimental conditions, showing typical potyvirus particles and inclusions in symptomatic leaves, when observed by transmission electron microscopy. Only part of the virus genome was known, a region comprising the 3' terminal region of the genome, which distinguished it sufficiently from other viruses to be classified as a new potyvirus species. The virus showed characteristics that were distinct from other known potyviruses, such as the high symptom severity in many plants and the ability to infect tomato plants, a crop of high economic and social importance in Brazil. These findings showed that it can be an excellent target for the study of genes related to pathogenicity and for the future development of viral vectors. Therefore, the objective of this study was the molecular characterization of the isolate Bs-Campinas through the determination of its complete genomic sequence and its phylogenetic analysis, when compared with different potyviruses previously reported in the world. For this purpose, some techniques were attempted to enable the rescue of the viral genome and subsequent determination of its sequence. Total RNA was extracted and cDNA synthesis was done by 3' RACE using universal *primers* for potyviruses, resulting in the amplification of a fragment of ca. 8,3 kb. However, the cloning of this fragment resulted in clones that presented an internal deletion in this fragment. Therefore, a second fragment using specific primers designed based on the sequence ends of the deleted clones, was amplified by PCR and cloned in order to rescue inner region of the genome by generating a fragment of approximately 4.7 kb. Specific primers were also designed based on the 5' end region of the 8,3 kb clone to enable cloning of the 5' terminal region of the genome by 5' RACE, a fragment of 1.8 kb. PCR amplifications resulted in three

cDNA fragments, comprising the complete genome of BsMoV. The RNA genome consisted of 9870 nt without a poly-A tail, encoding a putative typical potyviral polyprotein of 3090 aa. Analysis of the amino acid sequence allowed the deduction of the cleavage sites, as well as the identification of conserved sequences and motifs within the sequence of each protein, in which the Bs-Campinas isolate displayed typical potyvirus genome strategy. Phylogenetic analysis, as well as comparisons with other species of the *Potyvirus* genus obtained on online databases revealed that this BsMoV sequence shared 63.7% nucleotide sequence with *Pepper mottle virus* (PepMoV), which was the best matched potyvirus sequence and, thus the most closely related species. Since this identity value is below the threshold of 76% nt identity presently used to discriminate *Potyvirus* species, it was confirmed that *Brugmansia suaveolens mottle virus* represents a new *Potyvirus* species.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar da espécie *Brugmansia suaveolens*, de flores vistosas, pendentes e de formato tubular. 18
- Figura 2.** Micrografia eletrônica de transmissão de secções finas de células parenquimáticas da folha de *Brugmansia suaveolens* com sintomas de mosqueado evidenciando as partículas e os efeitos citológicos causados pelo isolado Bs-Campinas. (A): vírions filamentosos e flexuosos presentes em extratos de folhas infectadas. (B): Secção longitudinal mostrando a presença de inclusões cilíndricas, típicas de infecção por potyvírus, no citoplasma. (C): Corte transversal mostrando as alterações morfológicas da proteína de inclusão citoplasmática em uma infecção viral, formando estruturas espirais. As setas em C indicam vírions presentes nas proximidades destas inclusões. M: mitocôndria (Lucinda *et al.*, 2008). 20
- Figura 3.** Organização genômica dos membros da família *Potyviridae*. (A): a barra verde representa a poliproteína resultante do processo de tradução, situada entre as regiões 5' UTR (com uma VPg ligada à sua extremidade) e 3' UTR (terminada em uma cauda de poliA). A barra roxa representa a pequena ORF da proteína PIPO, recentemente descoberta. (B): as 10 proteínas funcionais resultantes do processo de clivagem da poliproteína pelas proteases virais P1 e HC-Pro (clivam seus respectivos C-terminais – setas vermelhas) e NIa-Pro (cliva os demais sítios de clivagem – triângulos). 21
- Figura 4.** Efeitos sintomatológicos causados por BsMoV. Sintomas de mosqueado em folhas de *Brugmansia suaveolens*. 25
- Figura 5.** Sintomas causados por BsMoV em ensaios com plantas experimentalmente infectadas. (A): Folhas de planta de tomate com mosqueado e clorose nas nervuras. (B): Plantas de *Physalis pubescens* sadia (direita) e infectada com BsMoV (esquerda), evidenciando a morte da planta. (C): Planta de *N. tabacum* cv. TNN exibindo pontos necróticos e necrose nas nervuras. (D): Sintomas necróticos em planta de *Nicotiana rustica* infectada. (E) e (F): Plantas de *Nicotina benthamiana* com forte necrose nas nervuras (E) e posterior morte da planta (F). 26
- Figura 6.** Posição em que os *primers* foram desenhados baseados nas regiões mais conservadas observadas através do alinhamento múltiplo das sequências completas de alguns membros do gênero *Potyvirus*. (A): *primer* 1680For; (B): *primer* 2280For e (C): *primer* 4495For. WPMV (*Wild potato mosaic virus*); PVV (*Potato virus V*); PTV (*Peru tomato mosaic virus*); PepMoV (*Pepper mottle virus*); PVY (*Potato virus Y*). 32
- Figura 7.** Posição dos *primers* utilizados para a amplificação dos produtos de PCR. 32
- Figura 8.** 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. A técnica tem como etapa inicial a síntese de uma fita de cDNA (em azul) tendo como molde o RNA viral (em verde), utilizando-se o *primer* GSP1 nesta reação de RT. Posteriormente, a reação é tratada com um mix de RNase, resultando na fragmentação do RNA molde ligado a fita de cDNA sintetizada.

Em seguida, o cDNA purificado é submetido a uma reação enzimática em que uma cauda de dCTP é estendida na sua porção 3' pela atividade da enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). Por fim, segue-se pela amplificação do cDNA utilizando-se um *primer* âncora (se liga à cauda de dCTP criada) e um segundo *primer*, GSP2 (mais interno a GSP1), resgatando desta forma, a porção 5' do genoma viral. 34

Figura 9. Mapa do vetor de clonagem *pCR 2.1 TOPO*, o qual apresenta a origem de replicação pUC e f1, sítios múltiplos de clonagem, gene *lacZ* e genes de resistência a ampicilina e canamicina (Invitrogen). 36

Figura 10. Mapa do vetor de clonagem *pCR 4 TOPO*, o qual apresenta a origem de replicação pUC, promotor *lacI*, sítios múltiplos de clonagem, gene letal *ccdB* e genes de resistência a ampicilina e canamicina (Invitrogen). 36

Figura 11. Fragmentos de BsMoV amplificados com diferentes combinações de *primers*. PCR1, refere-se ao primeiro fragmento amplificado (~8,3kb) da combinação dos *primers* 1680For e M4. A barra em laranja neste fragmento representa uma região de deleção que foi observada nos clones digeridos (EcoRI) e sequenciados. PCR2, refere-se ao segundo fragmento amplificado (~4,7kb, abrangendo a região deletada) resultante da combinação dos *primers* C1GRFor e C2GRRev. PCR3, refere-se ao terceiro e último fragmento amplificado (~1,8kb) obtido por 5'RACE combinando os *primers* 5'R anchor e GSP2. 40

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Amplificação por PCR do primeiro fragmento genômico. (M) Marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), (1) PCR com os *primers* 1680For + M4, com amplificação do fragmento de ~8,3Kb; (2) PCR com os *primers* 2280For + M4; e (3) PCR com os *primers* 4495For + M4, nos quais não houve amplificação. 41

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Amplificação por PCR do segundo fragmento genômico. (M) Marcador 1Kb (Invitrogen), (1) PCR com os *primers* C1GRFor + C2GRRev, em que houve a amplificação do fragmento de ~4,7Kb. 42

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Padrão de digestão dos clones selecionados. (M) Marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); linhas (1), (3) e (5) referentes aos clones 1, 2 e 3 não digeridos, respectivamente; linhas (2), (4) e (6) referentes aos clones 1, 2 e 3 digeridos com EcoRI, respectivamente. 42

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Amplificação por PCR do terceiro fragmento genômico obtido por 5'RACE. (M) Marcador *1Kb plus DNA ladder* (Invitrogen), (1) PCR com os *primers* 5' R anchor + GSP2, em que houve a amplificação do fragmento de ~1,8Kb. 43

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Padrão de digestão dos clones selecionados. (M) Marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); linhas (1), (3), (5), referentes aos clones 2, 3 e 10 não digeridos, respectivamente; linhas (2), (4), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14) e (15) referentes aos clones 2, 3, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 digeridos com EcoRI, respectivamente. 44

Figura 17. Representação esquemática da organização genômica de BsMoV mostrando as proteínas codificadas em cistrons. Os números abaixo do genoma indicam o início de cada região. Os prováveis sítios de clivagem das proteases na poliproteína estão indicados acima do genoma..... 46

Figura 18. Árvore filogenética ilustrando o relação das sequências genômicas completas (em nucleotídeos) entre BsMoV e outros potyvírus (vírus/número de acesso). Apenas valores de bootstrap (%) maiores que 60 são mostrados. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Combinação de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para amplificação do cDNA viral.	33
Tabela 2. Comparação das sequências nucleotídicas do genoma completo e de partes do genoma correspondendo a cada proteína de BsMoV com as sequências dos potyvírus mais estreitamente relacionados.	45
Tabela 3. Prováveis sítios de clivagem da poliproteína viral de BsMoV.	47

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Família Solanaceae	16
1.2. <i>Brugmansia suaveolens</i>	17
1.3. Família <i>Potyviridae</i>	19
1.3.1. Gênero <i>Potyvirus</i>	22
1.3.2. <i>Brugmansia suaveolens mottle virus</i> (BsMoV)	24
2. HIPÓTESES	28
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Fonte do vírus	30
4.2. Extração do RNA viral.....	30
4.3. RT-PCR	30
4.3.1. Síntese do cDNA	30
4.3.2. Amplificação do cDNA por PCR	31
4.4. Confirmação da amplificação em gel de agarose	34
4.5. Eluição do fragmento amplificado	35
4.6. Ligação do cDNA ao vetor de clonagem.....	35
4.6.1. Adenilação.....	37
4.6.2. Ligação	37
4.7. Transformação de bactérias <i>E. coli</i> por eletroporação.....	37
4.8. Extração do DNA plasmidial.....	37
4.9. Verificação da presença do inserto	38
4.10. Sequenciamento automático.....	38
4.11. Análise das sequências	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Clonagem do genoma.....	40
5.2. Análises da sequência genômica.....	44
5.3. Análise Filogenética	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO A	66
ANEXO B	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Solanaceae

Classificada no grupo Solanales (APGIII, 2009), a família Solanaceae, grupo monofilético com cerca de 150 gêneros e 3000 espécies está entre as famílias botânicas de maior importância econômica do mundo (Wu & Tanksley, 2010). Com uma distribuição concentrada na região neotropical, porém de ocorrência cosmopolita, tem a América do Sul como um dos seus principais centros de diversidade e endemismo (Olmstead *et al.*, 2008). É a terceira família de plantas economicamente importantes e ocupa o primeiro lugar em termos de hortaliças (Wu & Tanksley, 2010). Sua relevância econômica se deve à diversidade de espécies cultivadas para a alimentação, como o tomate (*Solanum lycopersicum*), a batata (*Solanum tuberosum*), as pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.), assim como, a utilização de espécies na fabricação de drogas (*Nicotiana tabacum*) e na indústria farmacêutica (*Atropa belladonna*) (Olmstead *et al.*, 2008; Souza & Lorenzi, 2008; Wu & Tanksley, 2010). Nos centros urbanos, algumas solanáceas são empregadas na ornamentação de casas, jardins e parques, como o manacá-de-cheiro (*Brunfelsia uniflora*) e a petúnia (*Petunia hybrida*), sendo também de grande interesse econômico (Souza & Lorenzi, 2008). Entre as espécies nativas do Brasil destacam-se a maria-pretinha (*Solanum americanum*), planta invasora de culturas; a fruta-do-lobo ou lobeira (*Solanum lycocarpum*), uma das espécies mais características do Cerrado; a jurubeba (*Solanum paniculatum*), muito utilizada como medicinal; e a dama-da-noite (*Cestrum* spp.), espécie ornamental com flores de odor característico forte (Souza & Lorenzi, 2008). Dentre os gêneros introduzidos estão: *Brugmansia*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Nicandra* e *Schizanthus* (Souza & Lorenzi, 2008).

As plantas pertencentes à família Solanaceae são conhecidas por produzirem alcalóides tropânicos, como a escopolamina, a hiosciamina e a atropina, grupo de metabólitos secundários tóxicos a artrópodes e vertebrados (Griffin & Lin, 2000; Kissmann & Groth, 1997). Estudos sugerem que os alcalóides tropânicos evoluíram como uma defesa contra o ataque de insetos herbívoros. Por esta razão, pesquisas

vêm sendo desenvolvidas com o intuito de avaliar a viabilidade de sua utilização no controle de insetos (Dequech *et al.*, 2008; Lovatto *et al.*, 2004).

A utilização de extratos de solanáceas para fins terapêuticos constitui-se também em outra importante característica destes metabólitos secundários. Preparados a partir de plantas da família Solanaceae já eram conhecidos dos antigos hindus e têm sido usados por médicos por muitos séculos em tratamentos terapêuticos empregando, por exemplo, as solanáceas *A. belladonna* (beladona), *Datura stramonium* (estramônio) e *Brugmansia suaveolens* (trombeteira) para estes fins (Bruneton, 2001; Simões *et al.*, 2007). Intoxicações acidentais, através da ingestão de folhas, flores e/ou frutos por crianças, ou pelo contato da seiva com os olhos durante a poda são comuns de ocorrerem. Todavia, são mais frequentes os casos relacionados ao uso das plantas na preparação de chás com finalidades alucinógenas (Bennett, 1992; Greene *et al.*, 1996).

1.2. *Brugmansia suaveolens*

Datura e *Brugmansia* são gêneros estreitamente relacionados que produzem alcalóides tropânicos, como hiosciamina e escopolamina como principais compostos de defesa (Wink, 1988). Plantas perenes e muitas vezes arbóreas constituem o gênero *Brugmansia* enquanto que plantas herbáceas anuais pertencem ao gênero *Datura* (Souza & Lorenzi, 2008). Espécies sul-americanas do gênero *Brugmansia* são utilizadas em práticas terapêuticas e mágicas da medicina folclórica peruana para alcançar estados alterados de consciência (de Feo, 1992). Há relatos também do emprego de espécies de *Brugmansia* por outras etnias, durante as práticas rituais para fins mágicos e curativos (Bennett, 1992).

A espécie *Brugmansia suaveolens*, cuja sinonímia botânica é *Datura suaveolens*, é uma Solanaceae arbustiva conhecida no Brasil como trombeteira, saia-branca ou cartucheira (Lorenzi & Souza, 2008; Souza & Lorenzi, 2008). Com altura variando de 1,8 a 4,6m de comprimento, este arbusto semi-lenhoso caracteriza-se por apresentar flores vistosas de formato característico (Fig. 1). Estas, além de grandes, pendentes e em forma tubular (semelhante a uma trombeta), chamam a atenção não só por sua exuberância, mas pela agradável fragrância que

exalam, podendo ocorrer nas cores branca, amarela e rosa. É comumente encontrada em locais úmidos, com muito material orgânico, sendo cultivada com frequência como ornamental, já que apresenta vigor diante do sol, fácil crescimento e beleza (Barg, 2004; Lorenzi & Souza, 2008). Apresenta compostos da classe dos alcalóides tropânicos com propriedades medicinais e narcóticas, os quais representam uma defesa química quando submetidas à herbivoria ou dano mecânico simulando herbivoria (Alves *et al.*, 2007). Suas propriedades farmacológicas se devem em razão desta solanácea possuir alcalóides tropânicos como atropina, hiosciamina e escopolamina em suas estruturas (Alves *et al.*, 2007; Zayed & Wink, 2004). Estas substâncias, que se caracterizam por apresentarem propriedades narcóticas, venenosas e alucinógenas, podem levar, em alguns casos, à taquicardia, vômito, náusea, confusão mental, mudanças repentinas de comportamento e alucinações (Andreola *et al.*, 2008; Havelius & Asman, 2002; Isbister *et al.*, 2003). Estudos, contudo, demonstram sua atividade analgésica, sendo comparada, em intensidade, à atividade analgésica presente na morfina, fármaco amplamente utilizado em ambiente hospitalar (Capasso & de Feo, 2003; Muccillo-Baisch *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2007). Neste sentido, esta solanácea tem sido empregada com finalidade terapêutica, sendo utilizada no tratamento de espasmos e cólicas, além de doenças como o mal de Parkinson, infecção urinária e problemas cardíacos (Bruneton, 2001; Gryniewicz & Gadzikowska, 2008).



Figura 1. Exemplar da espécie *Brugmansia suaveolens*, de flores vistosas, pendentes e de formato tubular.

As solanáceas, de forma geral, podem ser acometidas de doenças causadas por diversos fitopatógenos, como fungos, bactérias, nematóides e vírus, os quais podem levar a perdas de importantes culturas agrícolas (Agrios, 2005). Dentre estas doenças, as causadas por vírus, principalmente aquelas transmitidas por insetos, são consideradas de grande importância, pois além de levarem a uma baixa produtividade e qualidade dos frutos, demandam o controle do vetor de transmissão (Agrios, 2005).

As doenças que acometem plantas de *Brugmansia* sp. ainda são pouco estudadas havendo dados escassos na literatura. Sabe-se, no entanto, da ocorrência das espécies virais *Colombian datura virus* (CDV – *Potyvirus*) e *Brugmansia mild mottle virus* (BMMV - *Tobamovirus*) infectando solanáceas deste gênero (Illmberger *et al.*, 2007; Kahn & Bartels, 1968; Salamon & Palkovics, 2005). Para *B. suaveolens*, especificamente, a situação não é diferente: o trabalho de Lucinda *et al.* (2008) é um dos poucos relatos da ocorrência de doenças em trombeta, relatando uma nova espécie de *Potyvirus* (família *Potyviridae*), *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV), como agente causal dos sintomas observados nesta solanácea. Além disso, a ocorrência do pospiviroid *Potato spindle tuber viroid* também é relatada na literatura (Verhoeven *et al.*, 2008).

1.3. Família *Potyviridae*

A Família *Potyviridae* é reconhecida atualmente como uma das maiores famílias de vírus de plantas. Abrangendo ca. 25% das espécies de vírus vegetais conhecidas, *Potyviridae* engloba espécies de grande importância agrícola, como o *Potato virus Y* (PVY), infectando tomate e batata; o *Soybean mosaic virus* (SMV), infectando soja; *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), infectando milho e cana de açúcar, e *Bean common mosaic virus* (BCMV), infectando feijão (Fauquet *et al.*, 2005; Riechmann *et al.*, 1992). Os membros desta família possuem partículas filamentosas flexuosas não envelopadas de 11 a 15nm de diâmetro (Fig. 2A e 2B). O genoma é caracterizado por uma fita simples de RNA senso positivo com tamanho variando entre 8500 e 11000 nucleotídeos. A ORF (*open reading frame*) codifica uma poliproteína (340 a 395 kDa) a qual é clivada em aproximadamente 10 proteínas

maduras (Fig. 3A e 3B). O comprimento das partículas varia entre os gêneros, em que os que apresentam um único segmento de RNA (monopartido) podem ter entre 650 e 900nm de comprimento e aquele com genoma bipartido com comprimentos de 250 a 300nm e 500 a 600nm de comprimento. Todos os membros da família apresentam uma proteína de origem viral (VPg) covalentemente ligada na extremidade 5' e uma cauda de poli(A) na extremidade 3' (Fauquet *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 1994) (Fig. 3A). A descoberta de uma pequena ORF dentro do cistron P3 da poliproteína, com tradução em fase de leitura diferente, foi evidenciada recentemente por Chung *et al.* (2008) em *Turnip mosaic virus* (TuMV) (Fig. 3A e 3B). Esta ORF, denominada PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*), tem característica bioinformática de codificação conservada ao longo de toda família *Potyviridae* (Chung *et al.*, 2008). Estudos envolvendo mutações nesta ORF vêm sendo desenvolvidos com o intuito de avaliar a relevância da expressão da proteína PIPO para o estabelecimento e sobrevivência do vírus na hospedeira, bem como, avaliar sua função dentro da célula vegetal (Chung *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2010; Wen & Hajimorad, 2010).

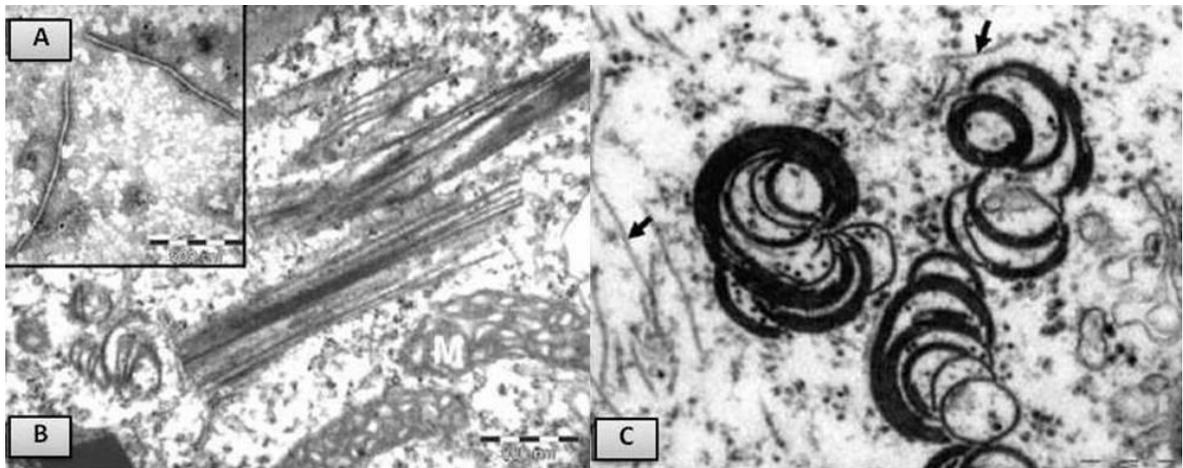


Figura 2. Micrografia eletrônica de transmissão de secções finas de células parenquimáticas da folha de *Brugmansia suaveolens* com sintomas de mosqueado evidenciando as partículas e os efeitos citológicos causados pelo isolado Bs-Campinas. (A): vírions filamentosos e flexuosos presentes em extratos de folhas infectadas. (B): Secção longitudinal mostrando a presença de inclusões cilíndricas, típicas de infecção por potyvírus, no citoplasma. (C): Corte transversal mostrando as alterações morfológicas da proteína de inclusão citoplasmática em uma infecção viral, formando estruturas espirais. As setas em C indicam vírions presentes nas proximidades destas inclusões. M: mitocôndria (Lucinda *et al.*, 2008).

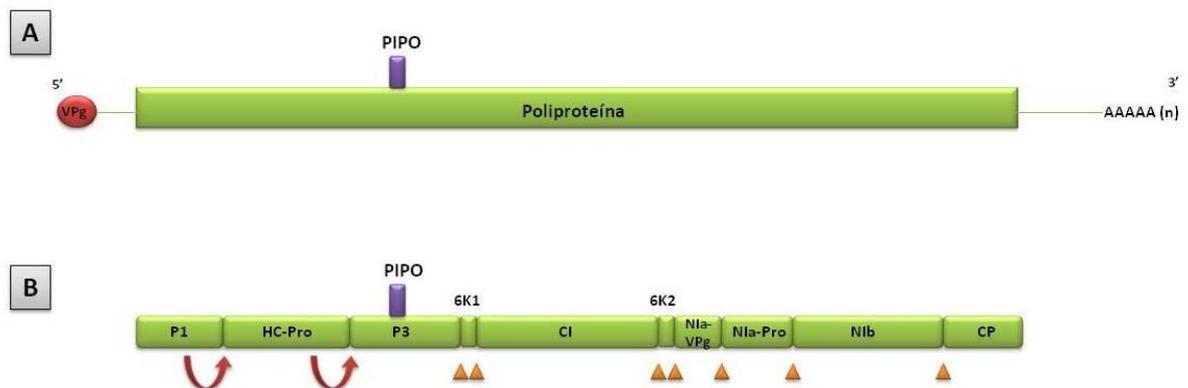


Figura 3. Organização genômica dos membros da família *Potyviridae*. (A): a barra verde representa a poliproteína resultante do processo de tradução, situada entre as regiões 5' UTR (com uma VPg ligada à sua extremidade) e 3' UTR (terminada em uma cauda de poliA). A barra roxa representa a pequena ORF da proteína PIPO, recentemente descoberta. (B): as 10 proteínas funcionais resultantes do processo de clivagem da poliproteína pelas proteases virais P1 e HC-Pro (clivam seus respectivos C-terminais – setas vermelhas) e NIa-Pro (cliva os demais sítios de clivagem – triângulos).

Uma característica intrínseca dos membros desta família é formação de inclusões citoplasmáticas cilíndricas (CI) as quais se desenvolvem durante a infecção viral nas células vegetais infectadas (Fig. 2C) (Edwardson, 1966). Estas inclusões são agregados estáveis da proteína CI produzidas pelo próprio vírus durante uma infecção (Fauquet *et al.*, 2005; Hull, 2002). Além disso, inclusões citoplasmáticas amorfas e inclusões nucleares cristalinas (NI) podem ser também formadas, mas nem todos os membros da família *Potyviridae* induzem essas formações. As inclusões citoplasmáticas amorfas são agregados da proteína HC-Pro produzidas pelos potyvírus, que, dentre outras funções, têm atividade proteolítica, de auxiliar a transmissão por afídeos, de movimento sistêmico e de supressor do silenciamento gênico. Já as inclusões nucleares cristalinas são compostas por duas proteínas, proteína de inclusão nuclear a (NIa) e proteína de inclusão nuclear b (NIb) (Fauquet *et al.*, 2005; Hull, 2002; Knuhtsen *et al.*, 1974). A proteína NIa consiste de dois polipeptídeos com funções distintas, VPg e Pro, em que o primeiro atua como iniciador da síntese de fitas de RNA negativo e o segundo como protease (Murphy *et al.*, 1996). A NIb, trata-se da polimerase (RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)) dos potyvírus, atuando na síntese de novas cópias do RNA viral (Lain *et al.*, 1989; Robaglia *et al.*, 1989).

Atualmente, são reconhecidos sete gêneros na família *Potyviridae* pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), com base nos vetores de transmissão e nas características genômicas, sendo eles: *Brambyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus* e *Potyvirus* (Adams *et al.*, 2005b; Carstens, 2010; Fauquet *et al.*, 2005; Hull, 2002). As espécies *Spartina mottle virus* (SpMV), *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) e *Tomato mild mottle virus* (TMMV), contudo, apesar de apresentarem características típicas dos potyvírus, ainda se encontram sem gênero definido e aguardam sua correta classificação (Gotz *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 1998; Monger *et al.*, 2001).

O gênero *Brambyvirus* é constituído por uma única espécie viral, a qual se caracteriza por apresentar um genoma de quase 11kb e um domínio AlkB em P1 (relacionado com o reparo de alquilações, por exemplo, metilações), sendo desconhecidos vetores de transmissão para este grupo. Sua espécie-tipo é *Blackberry virus Y* (BVY) (Carstens, 2010; Susaimuthu *et al.*, 2008). O gênero *Ipomovirus* é constituído por quatro espécies e caracteriza-se por apresentar genoma monopartido, sendo transmitido por mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Sua espécie-tipo é o *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV). O gênero *Macluravirus* é constituído por seis espécies, possui genoma monopartido com partículas de comprimento inferior a 700nm e são transmitidos por afídeos. Sua espécie-tipo é o *Maclura mosaic virus* (MacMV). O gênero *Tritimovirus* possui quatro espécies e um genoma monopartido, sendo transmitidos por ácaros (gênero *Aceria*) apenas às gramíneas. Sua espécie-tipo é o *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). O gênero *Rymovirus* possui três espécies e um genoma monopartido, sendo também transmitidos por ácaros (gênero *Abacarus*) às gramíneas. Sua espécie-tipo é o *Ryegrass mosaic virus* (RGMV). O gênero *Bymovirus* possui seis espécies e apresenta genoma bipartido, sendo transmitido por fungos às gramíneas. Sua espécie-tipo é o *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV). O gênero *Potyvirus*, por sua vez, por se tratar do gênero mais importante da família *Potyviridae*, será descrito a seguir em um tópico separado.

1.3.1. Gênero *Potyvirus*

O gênero *Potyvirus*, dentre os mais de 70 gêneros de vírus de planta existentes, é um dos maiores grupos de fitovírus. Com mais de 100 espécies, compreende cerca de 16% de todos os vírus vegetais já identificados (Fauquet *et al.*, 2005; Hull, 2002; Shukla *et al.*, 1994). É o maior gênero da família *Potyviridae*, possuindo expressiva importância econômica por apresentar espécies que afetam uma grande variedade de culturas agrícolas. São responsáveis, na maioria das vezes, por perdas significativas em culturas de batata, pimentão e tomate por todo o mundo. Possui como espécie-tipo o *Potato virus Y* (PVY).

Os membros deste gênero são transmitidos por afídeos sendo a relação de transmissão do tipo não-persistente. Nesta forma de transmissão, o vírus associa-se com o estilete do inseto-vetor, sendo adquirido e inoculado durante picadas de prova nas plantas. A rapidez com que ocorre este tipo de transmissão representa o maior desafio para a prevenção e controle de viroses causadas por potyvírus. Além desta forma de transmissão, os potyvírus podem ser experimentalmente transmitidos por inoculação mecânica (Hull, 2002; Zambolim *et al.*, 2000). Dentre as espécies de afídeo de maior ocorrência está *Myzus persicae*, espécie polífaga capaz de transmitir mais de 100 espécies de vírus fitopatogênicos.

Os membros do gênero *Potyvirus* possuem partículas filamentosas flexuosas (Fig. 2A e 2B) com 680 a 900nm de comprimento e 11 a 13nm de diâmetro, encapsidando um genoma monopartido de RNA fita simples (senso positivo) com genoma de cerca de 10kb. Além da ORF PIPO, o RNA viral é caracterizado por apresentar uma longa ORF flanqueada por uma região 5' não traduzida (5' UTR), com uma VPg ligada covalentemente à sua extremidade, e por uma região 3' não traduzida (3' UTR) terminada em cauda de poli-A (Fig. 3A) (Fauquet *et al.*, 2005). A ORF é expressa como uma poliproteína precursora de cerca de 340kDa (3000-3300 aminoácidos), a qual é clivada em 10 proteínas funcionais através da atividade de três proteases presentes na poliproteína. As proteases P1 e HC-Pro clivam apenas seus respectivos C-terminais, enquanto o restante dos sítios proteolíticos são processados pela protease NIa-Pro (Fig. 3B) (Carrington *et al.*, 1990). A principal consequência dessa estratégia de expressão gênica é que todas as proteínas virais são produzidas em quantidades estequiometricamente idênticas, independentemente da quantidade necessária para o vírus completar seu ciclo de infecção. O excesso de proteínas acumula nas células hospedeiras como corpos de inclusão citoplasmáticos e nucleares (Dougherty & Hiebert, 1980). A formação de

inclusões citoplasmáticas cilíndricas (Fig. 2C), conhecidas também como inclusões catavento, são efeitos citológicos característicos de infecções por membros deste gênero, em que a associação de partículas junto a estas estruturas pode ou não ocorrer (Dougherty & Hiebert, 1980; Edwardson, 1966). Esta estratégia de expressão gênica é extremamente dispendiosa para a célula hospedeira, o que é refletido pelos severos sintomas normalmente induzidos pelos potyvírus em plantas infectadas (Fauquet *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 1994).

Os critérios atualmente adotados pelo ICTV para a delimitação de novas espécies dentro do gênero *Potyvirus* baseiam-se na identidade de 80% das sequências de aminoácidos da capa protéica e 85% de identidade das sequências de nucleotídeos do genoma completo (Fauquet *et al.*, 2005). Porém, Adams *et al.* (2005) sugerem uma identidade de 77% e 76% das sequências de nucleotídeos da capa protéica e do genoma completo, respectivamente, como sendo suficiente para delimitar uma nova espécie de vírus dentro do gênero *Potyvirus*. Além disso, seus estudos mostram que a comparação da sequência do gene CI é mais representativa do genoma viral completo para o estudo taxonômico dos potyvírus, caso só estejam disponíveis sequências parciais do genoma (Adams *et al.*, 2005b; Fauquet *et al.*, 2005).

1.3.2. *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV)

Durante a inspeção da coleção de plantas medicinais do Instituto Agronômico, localizado em Campinas, SP, verificou-se que alguns exemplares da espécie *B. suaveolens* apresentavam sintomas de mosqueado em suas folhas (Fig. 4). Os resultados iniciais de caracterização biológica, microscópica e molecular (sequenciamento parcial incluindo a região 3'UTR, CP e parte de N1b) obtidos para o isolado Bs-Campinas confirmaram como agente etiológico o vírus pertencente ao gênero *Potyvirus* (*Potyviridae*), sugerindo ser este um potyvírus de propriedades bem distintas das demais espécies conhecidas (Lucinda *et al.*, 2008).



Figura 4. Efeitos sintomatológicos causados por BsMoV. Sintomas de mosqueado em folhas de *Brugmansia suaveolens*.

Segundo Lucinda *et al.* (2008), o vírus (isolado Bs-Campinas) foi capaz de infectar algumas solanáceas (causando em algumas delas sintomas necróticos severos, resultando na morte da planta, Fig. 5) e duas espécies de *Chenopodium*, sendo transmitido por afídeos. Folhas sintomáticas continham partículas filamentosas flexuosas e inclusões cilíndricas (Fig. 2A-C). A amplificação por RT-PCR usando *primers* universais para potyvírus produziu um fragmento de DNA de 1851 nt, correspondendo à região genômica da extremidade 3', abrangendo as sequências da região 3'UTR (*untranslated region*), CP (capa protéica) e a sequência parcial do gene NIb (replicase). Esta sequência (1851 pb) compartilhou 71% de identidade nucleotídica com a região correspondente de *Pepper mottle virus* (PepMoV), a sequência de potyvírus de maior identidade (Lucinda *et al.*, 2008).

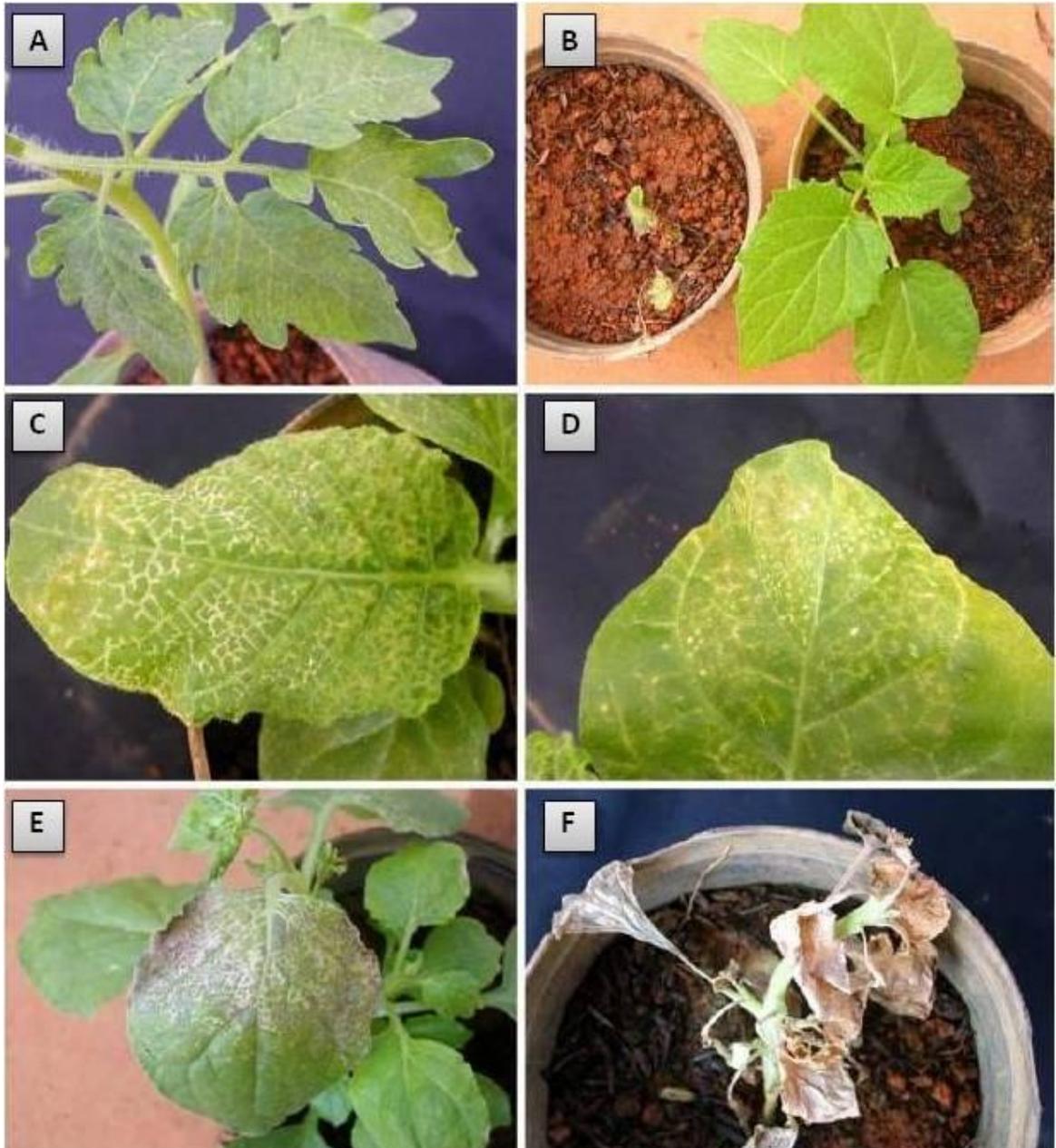


Figura 5. Sintomas causados por BsMoV em ensaios com plantas experimentalmente infectadas. (A): Folhas de planta de tomate com mosqueado e clorose nas nervuras. (B): Plantas de *Physalis pubescens* sadia (direita) e infectada com BsMoV (esquerda), evidenciando a morte da planta. (C): Planta de *N. tabacum* cv. TNN exibindo pontos necróticos e necrose nas nervuras. (D): Sintomas necróticos em planta de *Nicotiana rustica* infectada. (E) e (F): Plantas de *Nicotina benthamiana* com forte necrose nas nervuras (E) e posterior morte da planta (F).

O nome *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV) foi sugerido para este vírus e espera-se pela elucidação de seu genoma inteiro para completar a sua caracterização molecular. Como este isolado induziu alta severidade de sintomas

em diversas plantas susceptíveis, bem como, foi capaz de infectar o tomateiro, uma cultura de alta importância econômica e social no Brasil, o estudo deste vírus é importante não apenas para sua utilização como vetor viral, mas também, para se antever possíveis epidemias no futuro, principalmente em razão do método de propagação da trombeta ser vegetativo, favorecendo a rápida disseminação do vírus (Lucinda *et al.*, 2008).

2. HIPÓTESES

Baseando-se em estudos realizados para espécies do gênero *Potyvirus*, bem como, para o vírus *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV), são formuladas as seguintes hipóteses:

1. Os membros do gênero *Potyvirus* apresentam em seus genomas, regiões conservadas que possibilitam a construção de *primers* para a amplificação de seus fragmentos genômicos por RT-PCR.
2. Os dados da sequência do genoma completo de BsMoV corroboram aqueles obtidos para a proteína capsidial.
3. Através da técnica de 5' RACE é possível resgatar a extremidade 5' do genoma viral.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo determinar a sequência completa do genoma do isolado Bs-Campinas de BsMoV e analisar o seu relacionamento filogenético com os diferentes potyvírus já relatados no mundo.

Os objetivos específicos a serem alcançados ao longo do desenvolvimento do projeto são:

- Determinar a sequência completa de BsMoV;
- Identificar e analisar as ORF;
- Realizar o estudo filogenético.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fonte do vírus

O isolado BS-Campinas de BsMoV foi isolado da planta ornamental *B. suaveolens* e inoculado mecanicamente em plantas de *Nicotiana tabacum*. As plantas de fumo inoculadas foram mantidas em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças, para a realização do estudo.

4.2. Extração do RNA viral

Partículas virais de BsMoV foram purificadas a partir de plantas de *N. tabacum* infectadas com o isolado Bs-Campinas segundo o método descrito para *Bean common mosaic virus* (Dusi & Carvalho, 1988). O RNA viral foi extraído de partículas purificadas utilizando-se o kit comercial Trizol LS Reagent (Invitrogen), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.3. RT-PCR

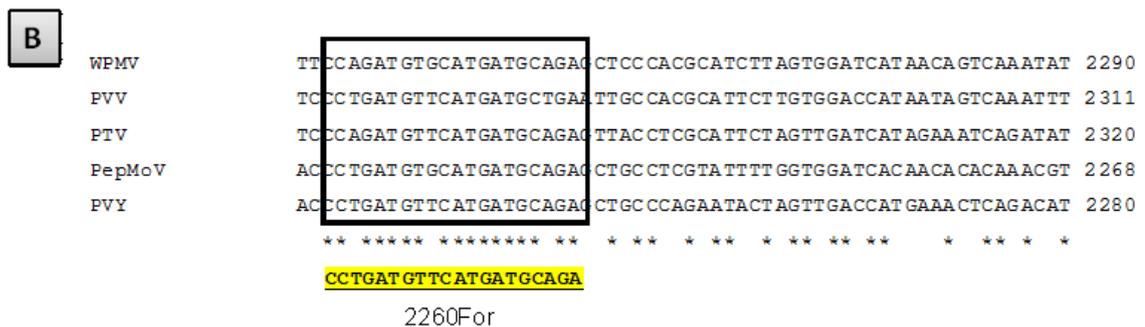
4.3.1. Síntese do cDNA

O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado por reação de transcrição reversa (RT) utilizando-se o oligo-dT 50T+Pacl+M4 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACT TAA TTA A(T)₅₀ - 3'), a transcriptase reversa, *SuperScript III* (Invitrogen) e o RNA viral extraído em 4.2. como molde. Este *primer* ancora-se na região 3' do genoma viral, onde está localizada a cauda poli(A), possibilitando o resgate do RNA viral na forma de cDNA.

A reação de transcrição foi realizada a uma temperatura de 55 °C por 1 h. Em seguida, essa reação foi submetida à incubação a 70 °C por 15 min para inativação da ação enzimática. Posteriormente, o cDNA foi tratado com 1 µL de RNase H (20 U/µL) (Invitrogen) pelo período de 30 min a 37 °C, para fragmentar as moléculas de RNA ligadas ao cDNA.

4.3.2. Amplificação do cDNA por PCR

Para amplificação do genoma viral, *primers* foram desenhados em regiões conservadas através do alinhamento múltiplo de sequências do genoma completo de *Wild potato mosaic virus* (WPMV), *Potato virus V* (PVV), *Peru tomato mosaic virus* (PTV), PepMoV e PVY depositadas no bancos de dados (Fig. 6; Tab. 1). A escolha destas sequências se deve ao fato de que estes potyvírus apresentam maior relacionamento filogenético com BsMoV no que se refere a sequência da capa protéica (Lucinda *et al.*, 2008).



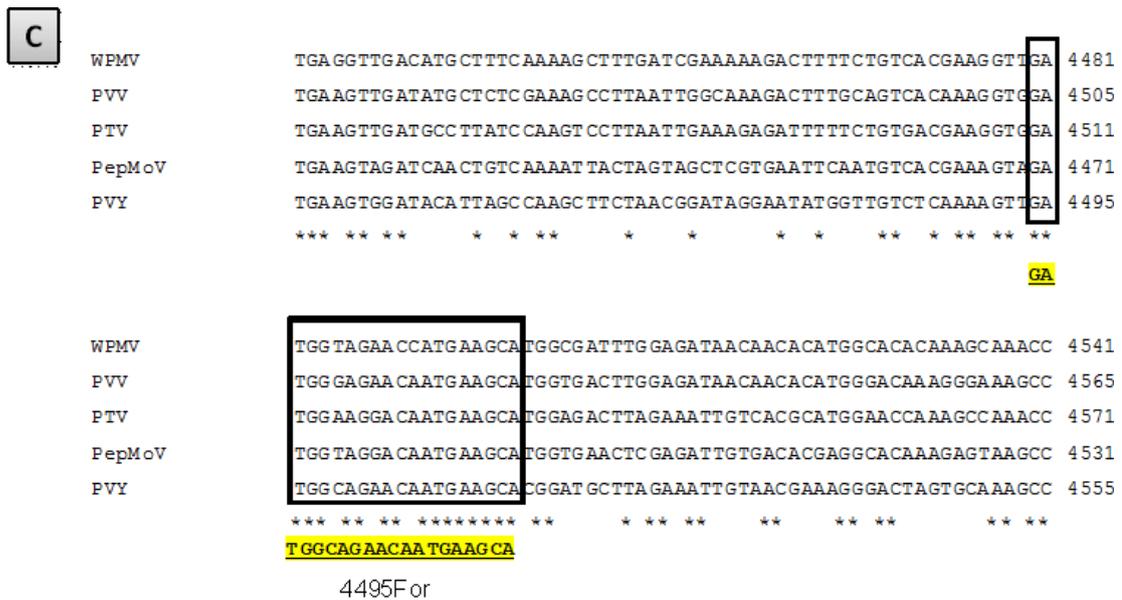


Figura 6. Posição em que os *primers* foram desenhados baseados nas regiões mais conservadas observadas através do alinhamento múltiplo das sequências completas de alguns membros do gênero *Potyvirus*. (A): *primer* 1680For; (B): *primer* 2280For e (C): *primer* 4495For. WPMV (*Wild potato mosaic virus*); PVV (*Potato virus V*); PTV (*Peru tomato mosaic virus*); PepMoV (*Pepper mottle virus*); PVY (*Potato virus Y*).

O cDNA foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase), empregando-se diferentes combinações de *primers* (Fig. 7; Tab. 1). Para esta reação utilizou-se a enzima *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), com o intuito de reduzir a amplificação de produtos inespecíficos, já que ela possui *hot start* automático e tem atividade de auto-correção (*proofreading*).

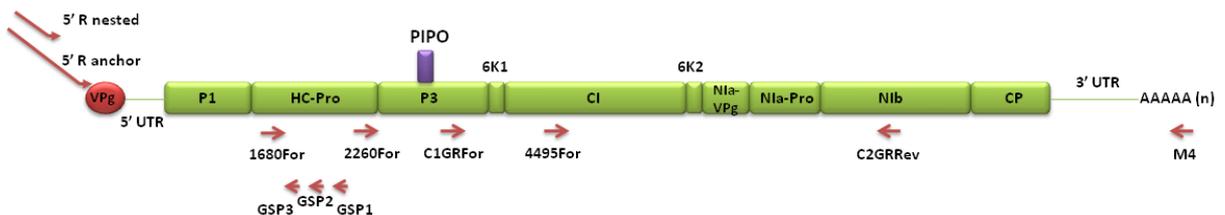


Figura 7. Posição dos *primers* utilizados para a amplificação dos produtos de PCR.

TABELA 1. COMBINAÇÃO DE *PRIMERS* UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO CDNA VIRAL.

Primer Forward (For)	Primer Reverse (Rev)	Tamanho (fragmento)
4495For 5'-GAT GGN AGA ACA ATG AAG CA-3'		5,5Kb
2280For 5'-CCW GAT GTK CAT GAT GCA GA-3'	M4 5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACT-3'	7,7Kb
1680For 5'-TGT GGG GAC AGA GGG AAT ATC ATG-3'		8,3Kb
C1GRFor 5'-GGC TTA CAA TGC TTC TGT TGA T-3'	C2GRRev 5'-TGT TCC TTC TGT TCA CTG GTG-3'	4,7Kb
*5' R nested 5'-ACC ACG ACA CCT CCA AGC AAG-3'	*GSP1 5'-CAT TTG GGT TCT TTC GGA TTG C-3'	1,8Kb
ou *5' R anchor 5'-AAA CCA CGA CAC CTC CAA GCA AGG GGI IGG GII GGG IIG- 3'	*GSP2 5'-CCT AAC TCA GGA TCA ATT ACT G-3'	
	*GSP3 5'-GCA TGG TAT TCC CGC TGT CC-3'	

*: *primers* utilizados na amplificação da extremidade 5' (5'RACE) do genoma.

A extremidade 5' do genoma viral, a qual exibe perfil de difícil amplificação, foi resgatada utilizando-se o kit comercial *5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen). A técnica *5'RACE* consiste, sobretudo, na extensão de uma cadeia de dCTP pela enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) na extremidade 3' do cDNA (recém sintetizado). Posteriormente, segue-se pela amplificação do cDNA utilizando-se um *primer* âncora que se liga à cauda de dCTP criada, permitindo, desta maneira, o resgate da porção 5' do genoma viral (Fig. 8). Para resgatar a extremidade 5' de BsMoV, empregou-se o *primer* GSP1 (posição 1787) na reação de transcrição reversa e, posteriormente, os *primers* GSP2 (posição 1752) e GSP3 (posição 1706) combinados com o *primer* 5'R anchor nas reações de PCR (Fig. 7; Tab.1).

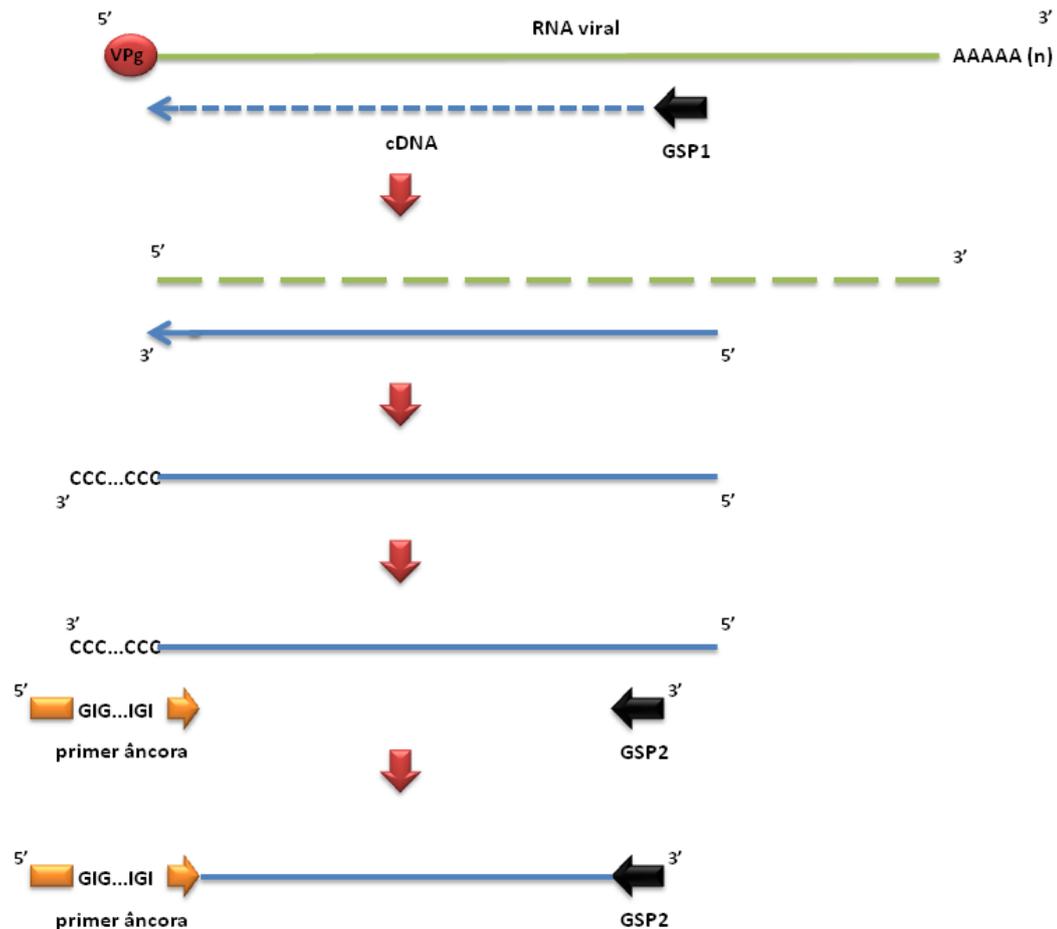


Figura 8. 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends. A técnica tem como etapa inicial a síntese de uma fita de cDNA (em azul) tendo como molde o RNA viral (em verde), utilizando-se o *primer* GSP1 nesta reação de RT. Posteriormente, a reação é tratada com um mix de RNase, resultando na fragmentação do RNA molde ligado a fita de cDNA sintetizada. Em seguida, o cDNA purificado é submetido a uma reação enzimática em que uma cauda de dCTP é estendida na sua porção 3' pela atividade da enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). Por fim, segue-se pela amplificação do cDNA utilizando-se um *primer* âncora (se liga à cauda de dCTP criada) e um segundo *primer*, GSP2 (mais interno a GSP1), resgatando desta forma, a porção 5' do genoma viral.

4.4. Confirmação da amplificação em gel de agarose

A amplificação do cDNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen) como marcador de peso molecular e brometo de etídeo, para possibilitar a visualização do fragmento amplificado através de luz ultravioleta (UV).

4.5. Eluição do fragmento amplificado

Com a confirmação da amplificação, a alíquota restante do cDNA foi aplicada em gel de agarose 1%, o qual foi posteriormente corado em uma solução de violeta cristal (4mg/mL) por cerca de 30 min sob agitação constante. A solução de violeta cristal é empregada nesta etapa, pois permite a visualização dos fragmentos de cDNA através da luz branca não sendo necessária a exposição do material à luz UV, a qual danifica o DNA. Sob luz branca, o fragmento de tamanho esperado foi excisado do gel com a utilização de uma lâmina descartável e posteriormente eluído, utilizando-se o kit de purificação *Perfectprep Gel Clean Up* (Eppendorf).

4.6. Ligação do cDNA ao vetor de clonagem

Para clonagem dos fragmentos amplificados, foram utilizados os vetores de clonagem *pCR 2.1 TOPO sequencing vector* e *pCR4 TOPO TA sequencing vector* (Invitrogen) (Fig. 9 e 10, respectivamente).

O vetor *pCR 2.1 TOPO* possui genes de resistência a ampicilina e canamicina, assim como a presença do gene *lacZ* para facilitar a seleção de colônias recombinantes. Já o vetor *pCR4 TOPO*, com genes de resistência para os mesmos antibióticos, permite a seleção direta das colônias recombinantes, já que possui o gene *ccdB* (letal para *E. coli*) no sítio de clonagem, o qual não é expresso quando há a ligação do produto de PCR (Bernard *et al.*, 1994). Portanto, as colônias formadas são apenas as de bactérias transformadas com plasmídeo recombinante, já que as células que contêm o vetor sem o inserto expressam o gene *ccdB* e, desta forma, não sobrevivem.

Ambos os plasmídeos, quando linearizados, apresentam extremidades coesivas com uma única desoxitimidina na extremidade 3' para facilitar a ligação e a clonagem direcional. Entretanto, é necessário garantir a presença de uma desoxiadenosina na extremidade 3' do cDNA a ser ligado nestes vetores.

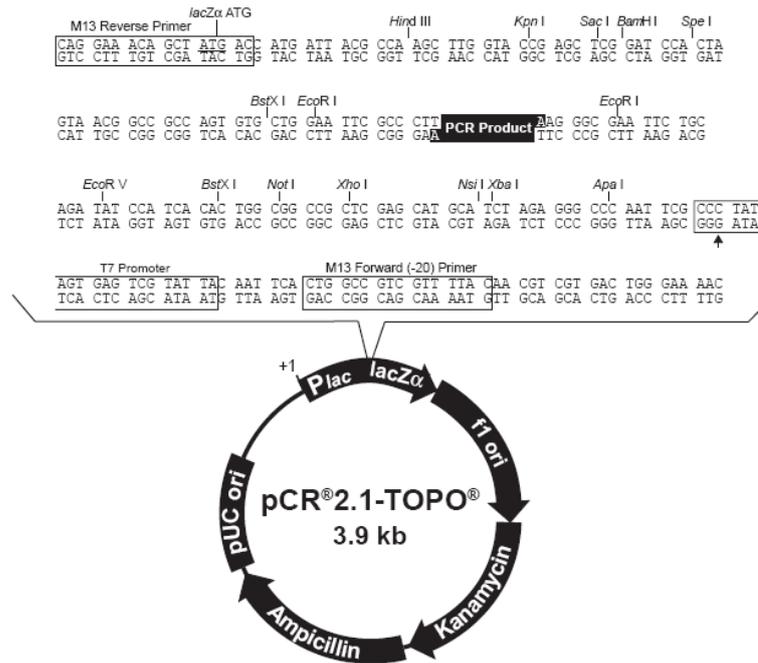


Figura 9. Mapa do vetor de clonagem *pCR 2.1 TOPO*, o qual apresenta a origem de replicação pUC e f1, sítios múltiplos de clonagem, gene lacZ e genes de resistência a ampicilina e canamicina (Invitrogen).

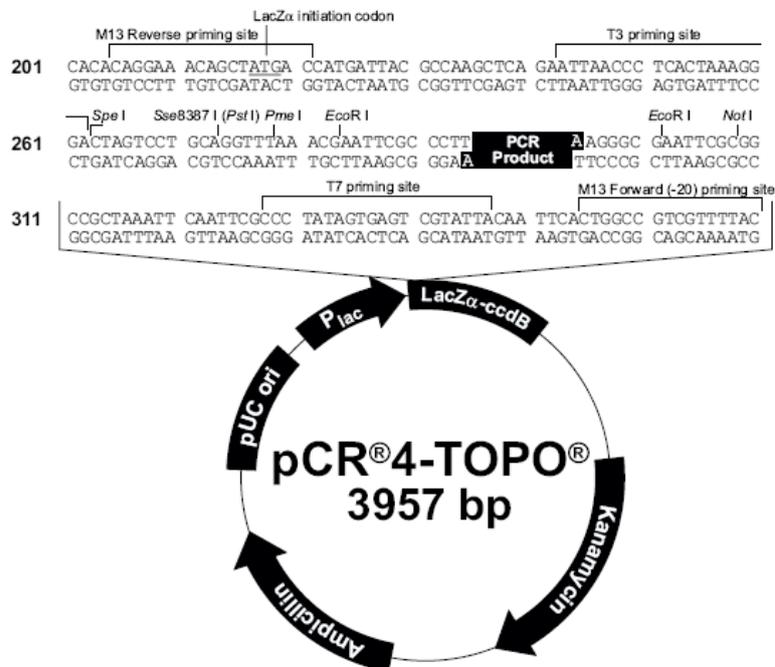


Figura 10. Mapa do vetor de clonagem *pCR 4 TOPO*, o qual apresenta a origem de replicação pUC, promotor *lacI*, sítios múltiplos de clonagem, gene letal *ccdB* e genes de resistência a ampicilina e canamicina (Invitrogen).

4.6.1. Adenilação

Devido à atividade de autocorreção (*proofreading*) da enzima *Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity*, desoxiadenosinas são retiradas das extremidades 3' dos fragmentos de PCR amplificados. Por esta razão, a reação de adição de desoxiadenosinas (adenilação) nas extremidades 3' dos fragmentos é necessária antes que haja a ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem. Para tanto, esta reação foi realizada no termociclador MasterCycler (Eppendorf) sob uma temperatura de 70 °C por 30 min utilizando-se a enzima *Taq DNA Polymerase* (New England BioLabs - NEB), o tampão *Standard Taq Buffer*, dATP (desoxiadenosina trifosfato) e como molde os produtos de PCR purificados a serem adenilados.

4.6.2. Ligação

Após a adenilação dos cDNA, os fragmentos foram ligados aos vetor de clonagem *pCR 2.1 TOPO* ou *pCR4 TOPO* (Invitrogen) na proporção de 1:3 (vetor:inserto) utilizando-se o kit *TOPO TA Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen). Os dois vetores são similares e a utilização de um dos dois neste trabalho foi condicionada à disponibilidade para uso durante a realização dos experimentos.

4.7. Transformação de bactérias *E. coli* por eletroporação

Para a transformação foram utilizadas células de *E. coli* cepa *DH5α*. As células foram preparadas e transformadas por eletroporação conforme o protocolo descrito na literatura (Sambrook & Russel, 2001).

4.8. Extração do DNA plasmidial

As colônias que cresceram na placa (meio LB-ágar contendo canamicina) foram selecionadas com auxílio de um palito de dente esterelizado e transferidas

para tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) e canamicina (50 µg/mL). Posteriormente, foram incubadas a 37 °C sob agitação constante de 240 rpm durante 16 h.

A extração do DNA plasmidial da cultura os inóculos foi realizada seguindo as instruções do kit comercial *Purelink™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen).

4.9. Verificação da presença do inserto

Os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI (Amersham Pharmacia), visto que os vetores *pCR 2.1 TOPO* e *pCR4 TOPO* possuem este sítio de restrição nas regiões flanqueadoras do inserto.

O padrão de digestão dos plasmídeos, quanto à presença do inserto, foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, utilizando o marcador molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen) como padrão de comparação.

Dentre os clones que apresentaram o padrão esperado, alguns foram selecionados e sequenciados.

4.10. Sequenciamento automático

Parte das sequências nucleotídicas dos fragmentos clonados foram determinadas com o sequenciador automático Perkin Elmer ABI-Modelo 377 utilizando o kit de sequenciamento com di-deoxynucleotídeos marcados com fluoróforos DYEnamic ET Terminator Cycle Sequence (Amersham Biosciences). Outros fragmentos tiveram suas sequências determinadas enviando-os para uma empresa sul coreana (Macrogen) especializada em sequenciamento. Foram utilizados *primers* dos vetores (*pCR 2.1 TOPO*: M13 e T7 e *pCR 4 TOPO*: T7 e T3) e *primers* internos desenhados por *Primer Walking*. A metodologia de *Primer Walking* baseia-se no desenho de *primers* que se anelam na região anteriormente sequenciada, para que desta forma, o cDNA viral possa ser totalmente sequenciado.

4.11. Análise das sequências

As sequências obtidas após o sequenciamento automático foram montadas com o auxílio do programa *Staden Package* (Staden *et al.*, 2003) com a retirada de bases com qualidade inferior a Phred 20, da região de poliadenilação e de sequências do vetor.

Através da ferramenta BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), disponível no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi, e do software DNAMAN (versão 4.0, Lynnon Biosoft), as sequências foram comparadas àquelas disponíveis nos bancos de dados de sequências nucleotídicas e de aminoácidos, na busca pela taxa de identidade entre as sequências.

A análise de sequências codificadoras sobrepostas, como o PIPO, foi realizada utilizando-se o software MLOGD (Firth & Brown, 2005; 2006), disponível no endereço eletrônico <http://guinevere.otago.ac.nz/aef/MLOGD/>.

O peso molecular das proteínas deduzidas foi calculado utilizando-se o programa Expasy, disponível em http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html.

O alinhamento múltiplo entre as sequências obtidas e sequências depositadas nos bancos de dados foi realizado através do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e o estudo filogenético foi feito por Neighbor-joining utilizando-se o programa Mega 4 (www.megasoftware.net).

5. RESULTADOS

5.1. Clonagem do genoma

O cDNA proveniente da reação de transcrição reversa, tendo como molde o RNA viral, foi submetido a reações de PCR com diferentes combinações de *primers* (Tab. 1) com o intuito de amplificar fragmentos abrangendo regiões distintas do genoma possibilitando, desta forma, o completo resgate do genoma viral. Para a clonagem do genoma de BsMoV a amplificação de três fragmentos genômicos foi realizada com sucesso, sendo que juntos possibilitaram o resgate completo do genoma deste potyvírus (Fig. 11).

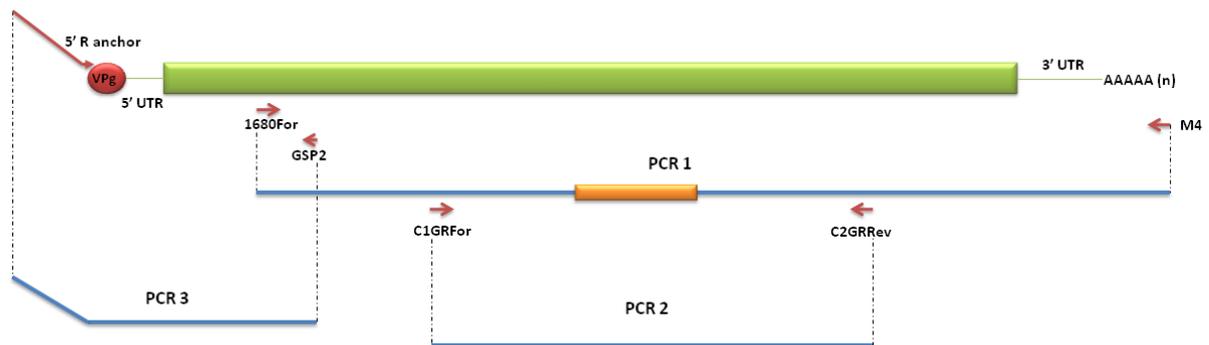


Figura 11. Fragmentos de BsMoV amplificados com diferentes combinações de *primers*. PCR1, refere-se ao primeiro fragmento amplificado (~8,3kb) da combinação dos *primers* 1680For e M4. A barra em laranja neste fragmento representa uma região de deleção que foi observada nos clones digeridos (EcoRI) e sequenciados. PCR2, refere-se ao segundo fragmento amplificado (~4,7kb, abrangendo a região deletada) resultante da combinação dos *primers* C1GRFor e C2GRRev. PCR3, refere-se ao terceiro e último fragmento amplificado (~1,8kb) obtido por 5'RACE combinando os *primers* 5'R anchor e GSP2.

O primeiro fragmento obtido, denominado PCR1, resultou da combinação dos *primers* 1680For e M4. Como esperado, o tamanho do fragmento foi de cerca 8,3kb, abrangendo a região genômica que codifica HC-Pro até a cauda de poli-A. As tentativas de amplificação com os *primers* 2280For e 4495For combinados com M4

não foram efetivas, já que não houve a amplificação de nenhum produto de PCR (Fig. 12).

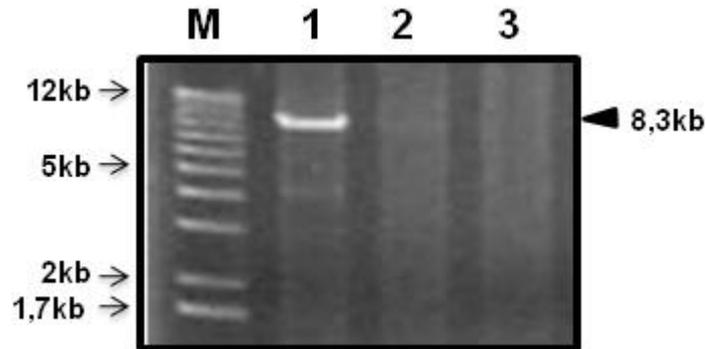


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Amplificação por PCR do primeiro fragmento genômico. (M) Marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen), (1) PCR com os *primers* 1680For + M4, com amplificação do fragmento de ~8,3Kb; (2) PCR com os *primers* 2280For + M4; e (3) PCR com os primers 4495For + M4, nos quais não houve amplificação.

As tentativas de clonagem do fragmento de 8,3kb ligado em vetor pCR 2.1 TOPO, contudo, resultaram em clones com fragmentos de tamanhos inferiores ao esperado. Apesar disso, os clones obtidos (1.4 e 1.31) foram enviados para sequenciamento constatando-se que havia ocorrido uma deleção na região interna do fragmento PCR1. As análises revelaram que o clone 1.4 apresentava parte da extremidade 5' do fragmento amplificado seguido por uma curta sequência da porção 3'. Já para o clone 1.31, constatou-se que este apresentava uma sequência curta referente à porção 5' do fragmento de 8,3kb seguida por uma longa sequência da extremidade 3'. Desta forma, para resgatar a região interna deletada foram desenhados novos *primers*, C1GRFor e C2GRRev (Fig. 11; Tab. 1), desenvolvidos com base na sequência dos fragmentos clonados, flanqueando regiões do genoma próximas à deleção, que abrangem a porção genômica entre P3 e N1b. A amplificação do cDNA com esta combinação de *primers* gerou um produto de PCR com tamanho de cerca de 4,7kb, como era esperado (Fig. 13).

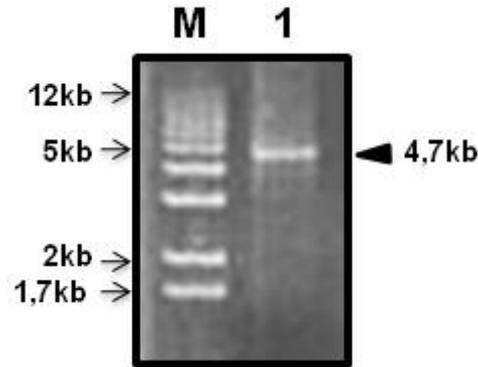


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Amplificação por PCR do segundo fragmento genômico. (M) Marcador 1Kb (Invitrogen), (1) PCR com os *primers* C1GRFor + C2GRRev, em que houve a amplificação do fragmento de ~4,7Kb.

O fragmento de 4,7kb, designado PCR2, foi posteriormente clonado em pCR 4 TOPO. O produto da digestão com EcoRI mostra que houve a clonagem deste fragmento, como pode ser observado para os clones 1, 2 e 3 selecionados (Fig. 14). Os clones apresentaram o mesmo padrão de digestão, exibindo um fragmento maior de cerca de 4kb referente ao vetor, seguida de três fragmentos, um de 3,2kb e outros menores de 1kb e 0,5kb, que juntos correspondem ao tamanho do fragmento clonado (Fig. 14). Após a confirmação da clonagem, foi determinada a sequência completa do inserto.

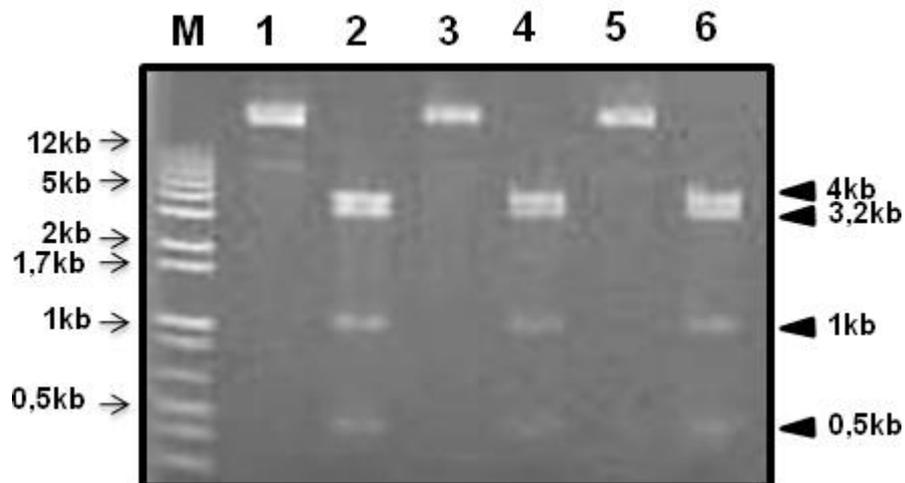


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Padrão de digestão dos clones selecionados. (M) Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); linhas (1), (3) e (5) referentes aos clones 1, 2 e 3 não digeridos, respectivamente; linhas (2), (4) e (6) referentes aos clones 1, 2 e 3 digeridos com EcoRI, respectivamente.

O último fragmento amplificado, denominado PCR3, foi obtido por 5'RACE combinando os *primers* 5' R anchor e GSP2 (Fig. 11; Tab. 1). Como esperado, a amplificação por PCR utilizando estes *primers* gerou um fragmento de 1,8kb, correspondendo à região entre a extremidade terminal 5' e a região que codifica HC-Pro (Fig. 15).

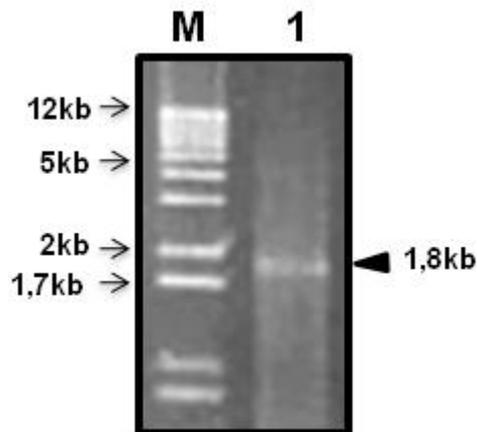


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Amplificação por PCR do terceiro fragmento genômico obtido por 5'RACE. (M) Marcador *1Kb plus DNA ladder* (Invitrogen), (1) PCR com os *primers* 5' R anchor + GSP2, em que houve a amplificação do fragmento de ~1,8Kb.

Posteriormente, o fragmento PCR3 foi clonado em vetor pCR 4 TOPO e os clones resultantes desta transformação foram, em seguida, selecionados para digestão com EcoRI, totalizando ao final doze clones. A digestão das preparações plasmidiais purificadas destes clones (Fig. 16) confirmou a clonagem do fragmento de DNA amplificado para dez clones (Fig. 16, linhas 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14 e 15), os quais apresentaram um fragmento de 4kb, referente ao vetor linearizado, e um fragmento de 1,8kb referente ao fragmento PCR3. Desta forma, os clones 1, 3 e 4 foram selecionados e a sequência do inserto determinada.

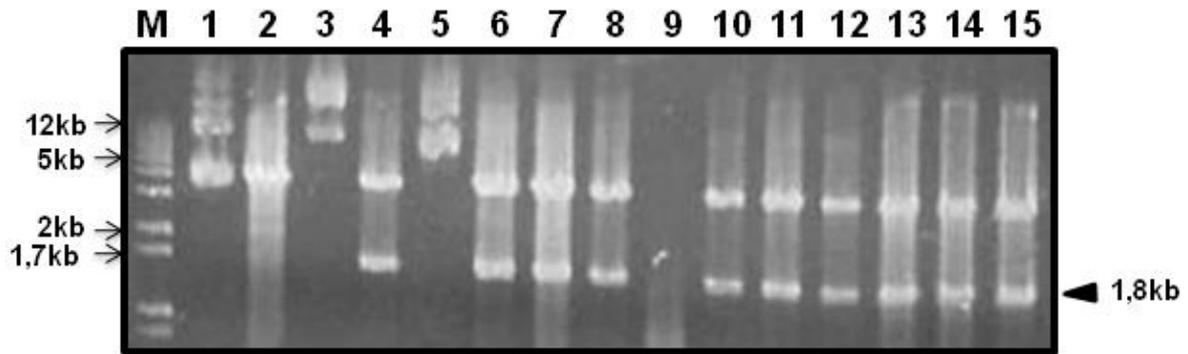


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 1%. cDNA corado com brometo de etídeo. Padrão de digestão dos clones selecionados. (M) Marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); linhas (1), (3), (5), referentes aos clones 2, 3 e 10 não digeridos, respectivamente; linhas (2), (4), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14) e (15) referentes aos clones 2, 3, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 digeridos com *EcoRI*, respectivamente.

O sequenciamento dos clones selecionados foi realizado utilizando-se inicialmente *primers* específicos dos vetores pCR 2.1 TOPO (M13 e T7) e pCR 4 TOPO (T3 + T7) e, posteriormente, *primers* internos desenhados à medida que os fragmentos foram sendo sequenciados (*primer walking*). Desta forma, a estratégia de *primer walking*, a qual permite sequenciar um novo segmento de DNA a partir de uma das extremidades já sequenciadas, possibilitou a obtenção da sequência completa do genoma do BsMoV.

5.2. Análises da sequência genômica

A sequência consenso para o genoma de BsMoV foi obtida mediante análises das sequências provenientes dos clones selecionados utilizando-se o programa *Staden 4.0* (Staden *et al.*, 2003). A sequência final do genoma foi depositada no banco de dados DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso AB551370 (Anexo A).

O genoma completo do isolado BS-Campinas compreende uma sequência de 9870 nucleotídeos (nt) de extensão, excluindo a cauda de poli-A, e regiões 5' UTR e 3' UTR com 187 nt e 409 nt de tamanho, respectivamente. Uma longa ORF, começando na posição 188 com uma sequência ATG e terminando na posição 9457

com um stop códon TAA, foi identificada. Esta fase aberta de leitura resulta na produção de uma longa poliproteína de 3090 aminoácidos (aa), com massa molecular calculada em 351kDa.

A análise comparativa entre a sequência nucleotídica do genoma completo de BsMoV com as sequências genômicas de outros potyvírus disponíveis no banco de dados revelou que dentre os potyvírus conhecidos PepMoV foi o que mostrou ser mais relacionado ao vírus em estudo, apresentando uma identidade nucleotídica de 63,72%, seguido por WPMV com 62,17% de identidade (Tab. 2).

Tabela 2. Comparação das sequências nucleotídicas do genoma completo e de partes do genoma correspondendo a cada proteína de BsMoV com as sequências dos potyvírus mais estreitamente relacionados.

*Vírus	Genoma	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	Nla-VPg	Nla-Pro	NIb	CP
PepMoV	63,72	44,94	63,82	54,72	75,64	69,78	55,77	69,86	66,12	71,54	74,36
WPMV	62,17	45,50	63,56	51,75	69,87	67,14	62,18	67,55	67,75	67,89	71,06
PTV	62,15	44,59	63,12	50,18	69,23	68,03	57,69	69,50	64,91	70,84	72,11
PVV	61,71	44,30	62,41	52,33	65,38	68,14	57,69	67,20	65,72	67,82	71,46
PVY	60,36	44,76	64,16	49,46	64,74	65,16	51,28	66,13	61,38	67,84	69,23
VVY	60,02	46,67	61,44	46,33	66,67	65,46	51,28	70,39	63,96	69,04	66,67

* Potyvírus cujas sequências foram comparadas: *Pepper mottle virus* (PepMoV, NC001517); *Wild potato mosaic virus* (WPMV, NC004426); *Peru tomato mosaic virus* (PTV, NC004573); *Potato virus V* (PVV, NC004010); *Potato virus Y* (PVY, NC001616); *Verbena virus V* (VVY, NC010735).

Para a determinação dos possíveis sítios de clivagem da poliproteína, a sequência deduzida de aminoácidos obtida para o BsMoV foi submetida a um alinhamento com a sequência da poliproteína de PepMoV. O objetivo deste alinhamento foi, sobretudo, realizar análises comparativas dos sítios de clivagem já determinados para PepMoV e, desta forma, identificar os prováveis sítios para BsMoV. A partir dessa análise e com base nas sequências conservadas dos sítios de clivagem preconizados em estudos anteriores (Adams *et al.*, 2005a) para a família *Potyviridae*, espera-se que dez proteínas maduras sejam produzidas a partir da poliproteína de BsMoV, sendo elas: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, Nla-VPg, Nla-Pro, NIb e CP (Fig. 17).

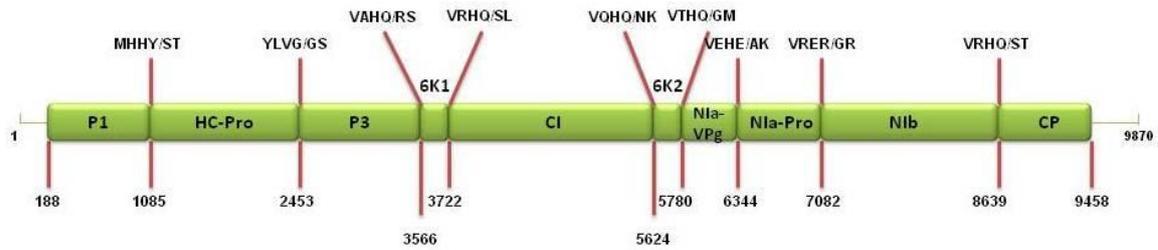


Figura 17. Representação esquemática da organização genômica de BsMoV mostrando as proteínas codificadas em cistrons. Os números abaixo do genoma indicam o início de cada região. Os prováveis sítios de clivagem das proteases na poliproteína estão indicados acima do genoma.

Análises do sítio de clivagem entre as proteínas P1 e HC-Pro, catalisada pela serina protease P1 em seu carboxi-terminal, indicam que esta ocorra entre os aminoácidos tirosina e serina (MHHY₂₉₉/S₃₀₀) do sítio ativo (Fig. 18). O produto desta clivagem resulta em uma proteína P1 (34kDa) com os motivos conservados GTSG (posição 248-251 da poliproteína) e FIVRG (posição 271-275) em sua sequência de aminoácidos, apresentando identidade nucleotídica de 46,67% com a sequência correspondente de Verbena virus Y (VVY) e de 45,50% com a de WPMV, as quais foram as sequências de potyvírus mais relacionadas (Tab. 2).

A junção HC-Pro/P3, por sua vez, é possivelmente clivada pela cisteína protease HC-Pro em seu carboxi-terminal, ocorrendo entre dois resíduos de glicina encontrados no contexto YLVG/G. As análises da sequência de aminoácidos desta protease indicam a presença de sequências conservadas como os motivos KMTTC (posição 349-352), FRNK (posição 478-481), IGN (posição 547-549), CCC (posição 589-591) e PTK (607-609). O gene da proteína HC-Pro resultante, com 456 aa de extensão e peso molecular de 51,7kDa, compartilhou 63,82% de identidade nucleotídica com a sequência correspondente de PepMoV e 64,16% com a de PVY, os potyvírus mais relacionados (Tab. 2).

Os demais sítios deduzidos para a poliproteína de BsMoV, muito provavelmente clivados pela cisteína protease NIa-Pro, apresentaram em sua grande maioria a sequência de aminoácidos XX(V/G)XX(Q/E)/(S/G/A) (Tab. 3), havendo em alguns casos ligeiras diferenças.

Tabela 3. Prováveis sítios de clivagem da poliproteína viral de BsMoV.

Junções	Sítio de Clivagem
P1/HC-Pro	MHHY ₂₉₉ /S ₃₀₀
HC-Pro/P3	YLVG ₇₅₅ /G ₇₅₆
P3/6K1	VAHQ ₁₁₂₆ /R ₁₁₂₇
6K1/CI	VRHQ ₁₁₇₈ /S ₁₁₇₉
CI/6K2	VQHQ ₁₈₁₂ /N ₁₈₁₃
6K2/NIa-VPg	VTHQ ₁₈₆₄ /G ₁₈₆₅
NIa-VPg/NIa-Pro	VEHE ₂₀₅₂ /A ₂₀₅₃
NIa-Pro/NIb	VRER ₂₂₉₈ /G ₂₂₉₉
NIb/CP	VRHQ ₂₈₁₇ /S ₂₈₁₈

Mediante análises da sequência de aminoácidos para a junção P3/6K1, o sítio de clivagem deduzido foi VAHQ₁₁₂₆/R₁₁₂₇, com o resíduo de arginina (R) ocorrendo na posição +1 (Fig. 17; Tab. 3). A proteína P3 liberada, com peso molecular calculado em 42kDa, apresenta o motivo EPY(X)₇SP(X)₂L, cuja sequência nucleotídica compartilha 54,72% e 52,33% com as sequências correspondentes de PepMoV e (PVV), respectivamente (Tab. 2).

A junção 6K1/CI, por sua vez, libera uma proteína 6K1 de 6kDa com resíduos de glutamina e serina ocorrendo no sítio de clivagem no contexto VRHQ/S (Fig. 17; Tab. 3). Os potyvírus PepMoV e WPMV foram os que mostraram ser mais estreitamente relacionados, apresentando identidades nucleotídicas com o BsMoV de 75,64% e 69,87%, respectivamente (Tab. 2).

Já a proteína CI, com peso molecular calculado em 71kDa, é liberada pela clivagem da junção CI/6K2 com resíduo de asparagina ocorrendo na posição +1 em seu sítio de clivagem VQHQ/N (Fig. 17; Tab. 3). Os motivos GXXGXGKS, IEPTRPL e DEXH foram localizados na sequência de aminoácidos deduzida para esta proteína, assim como as sequências conservadas KVSAAPP, LVYV, VATNIIENGVTL e GERIQLGRVGR. Valores de identidade nucleotídica de 69,78% e 68,14% para PepMoV e PVV, respectivamente, foram os maiores valores obtidos nas análises comparativas avaliando a sequência da região que codifica CI (Tab. 2).

Para a junção 6K2/Nla-VPg, o sítio de clivagem deduzido indica que resíduos de glutamina e glicina ocorram no contexto VTHQ/G (Fig. 17; Tab.3), liberando uma proteína 6K2 de peso molecular calculado em 6kDa, a qual compartilha 62,18% de identidade nucleotídica com WPMV e 57,69% de identidade nucleotídica com PVV e PTV (Tab. 2).

A proteína Nla-VPg (22kDa), cuja sequência de nucleotídeo compartilhou identidade de 70,39% com VVY (Tab. 2), o potyvírus mais relacionado, é liberada a partir do processamento da junção Nla-VPg/Nla-Pro com resíduos de ácido glutâmico e alanina ocorrendo em seu sítio de clivagem VEHE/A (Fig. 17; Tab. 3). O resíduo conservado de tirosina (Y) foi identificado no contexto MYGF (posição 1927-1930) da sequência de aminoácidos desta proteína.

O resíduo de arginina ocorrendo na posição -1 (VRER/G) foi identificado na junção Nla-Pro/Nlb (Fig. 17; Tab. 3), liberando a protease Nla-Pro com peso molecular calculado de 28kDa, cuja sequência de nucleotídeo compartilhou identidade de 67,75% com a sequência de WPMV (Tab. 2), o qual mostrou-se ser o potyvírus mais relacionado. O motivo H(X)₂D(X)₃GHCG, com os resíduos conservados de histidina, ácido aspártico e cisteína, foram localizados no contexto HWISTDDGHCG da sequência de aminoácidos de BsMoV.

Para a liberação das proteínas Nlb e CP, os resíduos de glutamina e serina foram identificados no sítio de clivagem sob o contexto VRHQ/S (Fig. 17; Tab. 3). Em Nlb, com peso molecular calculado de 59kDa, foram identificados os resíduos conservados SLKAEL, ADGSQFD, FDSS e TG(X)₃T(X)₃NS(X)₃₀GDD, já em CP (32kDa) os motivos DAG, MVWCIENGTSP, AFDF e QMKAAA foram identificados. O potyvírus PepMoV mostrou-se ser o mais estreitamente relacionado, tendo apresentado valores de identidade nucleotídica de 71,54%, para a sequência de Nlb e de 74,36% para a sequência de CP (Tab. 2).

Para análise e identificação de PIPO, a sequência completa do genoma de BsMoV foi submetida a alinhamentos múltiplos com as sequências dos potyvírus mais relacionados e, posteriormente, utilizou-se o software MLOGD (Chung *et al.*, 2008). A fase aberta de leitura para PIPO foi identificada entre os nucleotídeos 2980 e 3222, gerando uma proteína de 80 aminoácidos, apresentando a sequência G₂AGA₅ no início do possível gene.

5.3. Análise Filogenética

Para análise da relação filogenética entre BsMoV e outros potyvírus foi realizado o alinhamento múltiplo da sequência completa de BsMoV com as sequências genômicas de outros membros do gênero disponíveis no banco de dados.

Na análise filogenética da sequência genômica completa observa-se o agrupamento de BsMoV com PepMoV em um ramo isolado da árvore (Fig. 18). Apesar de formarem um ramo isolado, estes agruparam-se em um ramo maior bem definido juntamente com os potyvírus PTV, PVV e WPMV. Estes agrupamentos foram também observados em análises filogenéticas comparando as sequências de CP e CI isoladamente (dados não mostrados).

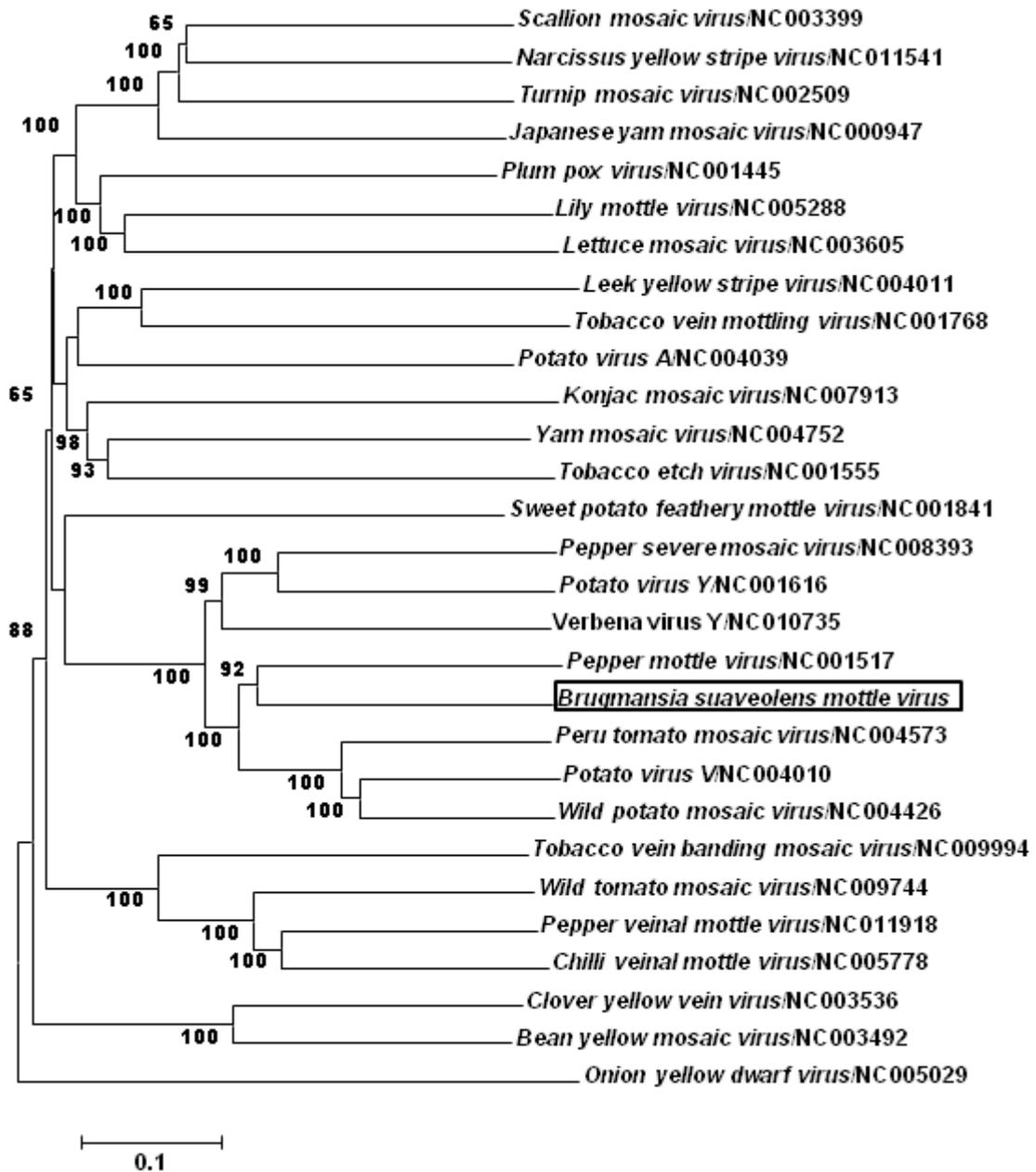


Figura 18. Árvore filogenética ilustrando o relação das sequências genômicas completas (em nucleotídeos) entre BsMoV e outros potyvírus (vírus/número de acesso). Apenas valores de bootstrap (%) maiores que 60 são mostrados.

6. DISCUSSÃO

A escassez de dados na literatura a respeito de infecções virais em plantas de *B. suaveolens* sugere que este trabalho seja o segundo relato de potyvírus infectando esta solanácea, acometida também pela espécie *Colombian datura virus* (CDV) (Salamon & Palkovics, 2005). Contudo, apesar de seu relato ser posterior ao de CDV, BsMoV foi o primeiro potyvírus infectando trombeteira a ser completamente sequenciado e caracterizado.

Os fragmentos de PCR obtidos possibilitaram o completo resgate da sequência genômica de BsMoV, consistindo em um RNA de 9870 nucleotídeos de extensão (excluindo a cauda de poli-A) tendo sido identificadas duas ORF em sua sequência, uma longa, resultando na tradução de uma poliproteína de 3090 aminoácidos e uma curta (PIPO), resultando em uma proteína de 80 aminoácidos.

Mediante análises da sequência da poliproteína, foi possível deduzir os resíduos de aminoácidos presentes em cada sítio de clivagem e, quando presentes, identificar os motivos conservados nas sequências de cada proteína viral.

A proteína P1, a primeira proteína madura de todos os potyvirus, é a mais variável e a região menos conservada do genoma (Adams *et al.*, 2005b). Por esta razão, apresentou a menor porcentagem de identidade nucleotídica em relação às demais proteínas virais, com valores que variaram de 44,30% a 46,67% de identidade em relação aos vírus PVV e VVY, respectivamente (Tab. 2). Contudo, sua porção C-terminal é relativamente conservada, apresentando resíduos e motivos conservados envolvidos na atividade proteolítica desta serina protease. Com atividade protease em *cis*, esta proteína é responsável pela clivagem da junção P1/HC-Pro tendo sido identificados na sequência de BsMoV os resíduos conservados de tirosina (Y) na posição 1 e de serina (S) na posição -1 em seu sítio de clivagem (MHHY/STSS) (Fig. 17; Tab. 3). Além disso, como descrito na literatura, resíduos conservados na posição 2 (histidina, H) e 4 (metionina, M), com propriedades aromáticas e altamente hidrofóbicas, respectivamente, foram identificados no sítio de clivagem de P1 (Adams *et al.*, 2005a), bem como, os motivos GTSG e FIVRG, responsáveis pela atividade autoproteolítica (Robaglia *et al.*, 1989; Verchot *et al.*, 1992; Verchot *et al.*, 1991).

A proteína HC-Pro, por sua vez, devido à sua função supressora de silenciamento gênico, tem sido bastante estudada nos últimos anos (Anandalakshmi *et al.*, 1998). Contudo, assim como outras proteínas virais, desempenha funções adicionais, por exemplo, como a de protease. Exibindo atividade em *cis*, como a proteína P1, esta protease do tipo cisteína age sob a junção HC-Pro/P3 com sítio entre resíduos de glicina (G) encontrados no motivo KXYXVG/G, o mais conservado dentre todos os sítios de clivagem (Adams *et al.*, 2005a; Carrington *et al.*, 1989; Carrington & Herndon, 1992). A conservação dos resíduos de tirosina (Y, posição 4), valina (V, posição 2) e glicina (G, posições 1 e -1) também pode ser observada para o sítio de clivagem de HC-Pro em BsMoV, encontrado no contexto YLVG₇₅₅G₇₅₆ (Fig. 17; Tab. 3). Além deste motivo, análises detalhadas da sequência desta revelaram a presença de motivos importantes para o ciclo viral. O motivo KMTC, envolvido na ligação da partícula viral ao estilete do afídeo, foi encontrado na posição 349-352, com resíduo de lisina (K), essencial para o processo de transmissão, ocorrendo na posição 4 (Atreya & Pirone, 1993; Atreya *et al.*, 1995). O motivo PTK dentro de HC-Pro, que estabelece a ligação entre as proteínas HC-Pro e CP (motivo DAG), foi também encontrado na sequência de BsMoV (posição 607-609), sendo importante para a transmissibilidade dos vírions pelo insetovetor. Juntos, estes motivos estabelecem o que alguns autores chamam de “*bridge hypothesis*”, em que HC-Pro media a ligação entre a partícula viral e o estilete do afídeo através de dois domínios, um de ligação à capa protéica (CP) do vírion e outro de ligação a receptores do aparelho bucal do vetor (Atreya *et al.*, 1990; Pirone & Blanc, 1996). Além das funções envolvendo a supressão do silenciamento gênico, o processamento da poliproteína, bem como, a transmissão por afídeo, esta proteína multifuncional está também relacionada aos processos de amplificação do genoma, de movimento sistêmico do vírus e de expressão dos sintomas (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001) e, neste sentido, motivos conservados relacionados a tais funções, foram também localizados na sequência de BsMoV. O motivo IGN, por exemplo, importante para o processo de amplificação do genoma e movimento sistêmico do vírus, foi encontrado na posição 547-549 (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997), assim como os motivos FRNK (posição 478-481) e CCC (posição 589-591), o primeiro, associado ao processo de supressão do silenciamento gênico e expressão dos sintomas (Gal-On, 2000; Shibolet *et al.*, 2007) e o segundo, ao movimento viral dentro da hospedeira (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997). Em se tratando de

valores de identidade nucleotídica para o gene de HC-Pro, o potyvírus mais estreitamente relacionado foi PVY, com 64,16% de identidade nucleotídica (Tab. 2), ficando abaixo do limiar de 75,7% estabelecido para a demarcação de espécies.

Em relação às demais proteínas, estas são liberadas através da clivagem pela cisteína protease NIa-Pro em seus respectivos sítios, sendo esta a mais bem estudada protease potyviral. Atuando em *cis* e *trans*, os sítios de clivagem da proteína NIa-Pro apresentam em sua grande maioria a sequência conservada XX(V/G)XX(Q/E)/(S/G/A), como pode ser observado na Tabela 3 (Adams *et al.*, 2005a; Carrington *et al.*, 1993).

A proteína P3, liberada pela clivagem da junção P3/6K1, é uma das menos estudadas dos potyvírus, exibindo elevada variabilidade de sequência dentre as demais proteínas, o que explica os baixos valores de identidade nucleotídica encontrados para ela, que variaram de 46,33% a 54,72% (Tab. 2). Por já ter sido encontrada associada às proteínas CI (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1993) e NIb (Langenberg & Zhang, 1997), as quais estão envolvidas diretamente na replicação viral, sugere-se que P3, à semelhança de P1, seja um fator acessório de amplificação do genoma, bem como, esteja relacionada à patogenicidade (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Apesar de pouco estudada, resíduos conservados de ácido glutâmico (E), prolina (P), tirosina (Y), serina (S) e lisina (L), envolvidos na regulação do processamento proteolítico, são encontrados com frequência em sua sequência, tendo sido localizados no contexto EPY(X)₇SP(X)₂L, como descrito na literatura (Riechmann *et al.*, 1992).

Os valores de identidade nucleotídica para as proteínas 6K1 e 6K2, apesar de exibirem certo grau de conservação, não são utilizados como critérios na delimitação de novas espécies dentro da família *Potyviridae*, talvez por não apresentarem importantes informações taxonômicas (Adams *et al.*, 2005b). Além disso, não há relatos na literatura quanto à presença de resíduos de aminoácidos ou motivos conservados nas sequências destas proteínas, a não ser os resíduos presentes nas junções 6K1/CI (VRHQ/S) e 6K2/NIa-VPg (VTHQ/G) (Fig. 17; Tab. 3), que quando clivados liberam, respectivamente, 6K1 e 6K2 com peso molecular de 6kDa cada. Em razão de ser pouco estudada, os dados a respeito da função desempenhada pela proteína 6K1 ainda são insuficientes para esclarecer sua funcionalidade, porém sugere-se estar relacionada à patogenicidade e replicação do genoma viral (Kekarainen *et al.*, 2002; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Em relação à

6k2, apesar de não possuir função enzimática estabelecida, possui um domínio central hidrofóbico que lhe confere a propriedade de associação a membranas, sugerindo que pode ser responsável por ancorar o complexo replicativo a membranas (Kekarainen *et al.*, 2002; Schaad *et al.*, 1997; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Indutora de inclusões citoplasmáticas do tipo catavento, CI, desempenha atividade de helicase nos potyvírus, separando fitas duplas de RNA produzidas durante a replicação (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Liberada pela clivagem da junção CI/6K2, apresenta em seu sítio de clivagem a sequência VQHQ/N (Fig. 17; Tab. 3), diferindo na posição -1 em relação à sequência conservada relatada na literatura, em que se verifica a ocorrência de um resíduo de asparagina ao invés de resíduos de serina, glicina ou alanina (Adams *et al.*, 2005a; Carrington *et al.*, 1993). Contudo, apesar de diferente, o resíduo de asparagina apresenta propriedades semelhantes as dos resíduos frequentemente encontrados nesta posição, o que provavelmente não deve afetar na estrutura terciária da proteína formada. Os motivos conservados, GXXGXGKS e IEPTRPL, envolvidos na ligação de CI à nucleosídeos trifosfatos (NTP), como descrito na literatura (Kadare & Haenni, 1997), foram encontrados nas posições 1263-1270 e 1286-1292, respectivamente. Já os aminoácidos conservados DECH (posição 1352-1355), IKVSAAPP (posição 1378-1385), LVYV (posição 1430-1433), VATNIIENGVTL (posição 1481-1492) e GERIQLGRVGR (posição 1525-1536), os quais são característicos de proteínas helicases e podem estar envolvidos na hidrólise de ATP, ligação ou abertura de fitas de RNA, foram também encontrados na sequência de CI de BsMoV (Liang *et al.*, 2006; Riechmann *et al.*, 1992). Esta proteína, que juntamente com NIa e NIb, forma o núcleo replicativo, catalisando processos enzimáticos essenciais durante a replicação, desempenha também papel no movimento célula-a-célula dos potyvírus (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Usando dados de identidade nucleotídica, estudos revelam que a sequência de CI fornece a melhor estimativa para a delimitação de novas espécies virais em relação às demais proteínas, quando comparadas à sequência da ORF inteira, com faixa de valores de identidade nucleotídica entre 38,4% e 78,2% (Adams *et al.*, 2005b). Neste sentido, BsMoV encontra-se abaixo do limiar estabelecido para demarcação de espécies utilizando-se a sequência desta proteína, já que uma identidade nucleotídica de 69,78% (Tab. 2) foi encontrada para PepMoV, o potyvírus mais estreitamente relacionado.

A proteína Nla, por sua vez, caracteriza-se por apresentar dois domínios, o domínio VPg na porção N-terminal, referente à proteína Nla-VPg e o domínio protease na porção C-terminal, referente à protease Nla-Pro (Riechmann *et al.*, 1992). A liberação da proteína Nla-VPg decorre da clivagem em *trans* da junção Nla-VPg/Nla-Pro pela protease Nla-Pro, a qual é liberada por sua atividade de autoclivagem (*cis*) sob a junção Nla-Pro/Nlb (Adams *et al.*, 2005a). A clivagem interna entre estes domínios ocorre de forma lenta, muitas vezes, resultando na separação parcial dos dois domínios de Nla, em que estudos sugerem estar relacionada a uma função regulatória (Schaad *et al.*, 1996). A presença do aminoácido ácido glutâmico (E) neste sítio de clivagem, é a única exceção relatada para resíduos que ocorram na posição 1 da junção Nla-VPg/Nla-Pro, o qual provavelmente está relacionado à lenta proteólise deste sítio. Análises da sequência de clivagem entre os domínios de Nla em BsMoV revelaram a presença deste resíduo, encontrado no contexto VEHE/A (Fig. 17; Tab. 3), como de fato é relatado na literatura (Adams *et al.*, 2005a). O domínio VPg tem funções essenciais na replicação viral, atuando como iniciadora da síntese de fitas de RNA negativo, por meio do grupamento hidroxil presente em um resíduo conservado de tirosina (Y) (Murphy *et al.*, 1996), encontrado no contexto MY₁₉₂₈GF da poliproteína em BsMoV. Já o domínio protease, como descrito anteriormente, está relacionado ao processamento da maioria dos sítios de clivagem da poliproteína potyviral, sendo sua atividade proteolítica caracterizada pela presença do motivo H(X)₂D(x)₃GHCG (Dougherty *et al.*, 1989), que em BsMoV apresentou-se com ligeira diferença quanto ao número de resíduos presentes entre os resíduos conservados, tendo sido encontrado no contexto H(X)₄D(X)₁GHCG (posição 2194-2204). Assim como HC-Pro e CI, sugere-se também a utilização da sequência de Nla-Pro na discriminação de novas espécies ao invés da sequência de CP, por exibirem padrões comparados ao da ORF completa (Adams *et al.*, 2005b). Neste sentido, por ter apresentado valores de identidade nucleotídica de 67,75% e 66,12% para WPMV e PepMoV (Tab. 2), respectivamente, os quais foram os potyvírus mais relacionados, BsMoV encontra-se também abaixo do limiar de 77,5% estabelecido para separação entre espécies quando se analisa a região Nla-Pro (Adams *et al.*, 2005b).

Um dos produtos gênicos mais conservados dentre os potyvírus, Nlb, apresentou elevados valores de identidade nucleotídica, como esperado, variando de 67,82% a 71,54% para as sequências de PVV e PepMoV (Tab. 2),

respectivamente. Esta que é a polimerase (RNA polimerase dependente de RNA, RdRp) dos potyvírus, tem como função principal a síntese de novas cópias do RNA viral (Domier *et al.*, 1987; Lain *et al.*, 1989; Robaglia *et al.*, 1989). Liberada pela clivagem da junção Nlb/CP, que em BsMoV ocorre no contexto VRHQ/S (Fig. 17; Tab. 3), foi possível identificar em sua sequência resíduos de aminoácidos e motivos conservados. Os resíduos conservados SLKAEL necessários para a atividade da RNA polimerase e ADGSQFD para ligação de NTP foram localizados nas posições 2468-2473 e 2545-2551, respectivamente. Além disso, o motivo característico das RdRp's foi identificado na sequência de BsMoV iniciando-se na posição 2608 da poliproteína sob o contexto TG(X)₃T(X)₃NS(X)₃₀GDD, como descrito na literatura, (Poch *et al.*, 1989; Wang & Gillam, 2001; Xiong & Eickbush, 1990).

A proteína capsidial (CP), envolvida em várias funções, como encapsidação do RNA viral, transmissão pelo vetor (Atreya *et al.*, 1990), movimento célula-a-célula (Dolja *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997) e movimento a longa distância (Dolja *et al.*, 1995), é a região mais frequentemente utilizada em comparações de sequências e em decisões taxonômicas devido à maior facilidade de obtenção de sua sequência completa. Apesar disso, estudos sugerem que as proteínas CI, HC-Pro, Nlb e Nla-Pro representam melhor o genoma completo do que a proteína capsidial (Adams *et al.*, 2005b). Ainda assim, CP vem sendo largamente empregada com essas finalidades e, portanto, o limiar estabelecido como critério de discriminação de espécies é de 76-77% de identidade nucleotídica (Adams *et al.*, 2005b). Com 74,36% de identidade nucleotídica para PepMoV (Tab. 2), o potyvírus mais estreitamente relacionado à BsMoV, o vírus em estudo fica abaixo do limiar estabelecido para demarcação de espécies. Esta proteína, amplamente empregada na discriminação de espécies, caracteriza-se por apresentar regiões com diferentes níveis de conservação e por isso, pode ser dividida em domínios. Os domínios variáveis, N-terminal e C-terminal e o domínio conservado, domínio central. Os domínios variáveis, os quais se encontram expostos na superfície da partícula viral, estão relacionados com as atividades de transmissão por afídeos e movimentos sistêmico e de célula-a-célula desempenhados por CP (Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*, 1994; Lopez-Moya *et al.*, 1999; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). É no N-terminal, por exemplo, que está presente o motivo DAG, altamente conservado dentre os potyvírus transmitidos por afídeos. Este motivo, que em BsMoV ocorre nas posições 2826-2828, é essencial para a transmissão das partículas virais e sugere-se que

haja uma forte correlação entre a transmissibilidade por afídeos e a interação CP/HC-Pro. Segundo estudos, os motivos DAG em CP e PTK em HC-Pro estariam envolvidos na interação entre estas duas proteínas necessárias para transmissão do vírus (Blanc *et al.*, 1997; Lopez-Moya *et al.*, 1999). Além de DAG, a presença das sequências conservadas MVWCIENGTSF, AFDF e QMKAAA foi também identificada na sequência de BsMoV nas posições 2939-2949; 3022-3025 e 3042-3047, respectivamente (Shukla *et al.*, 1994). Em relação ao domínio central, este está relacionado à principal função desempenhada por CP, a encapsidação do RNA viral, sendo somente ele necessário para esta função. A proteína do capsídeo interage de perto com o RNA no interior do vírion e forma subunidades de contato necessárias para a montagem e estabilidade da partícula (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Já PIPO, ORF traduzida no quadro de leitura +1 em BsMoV, encontra-se presente dentro do cistron de P3, tendo sido identificada entre os nucleotídeos 2980 e 3222. Contudo, ao invés de apresentar o motivo $G_{1-2}A_{6-7}$, como descrito na literatura para vários potyvírus (Chung *et al.*, 2008), esta ORF em BsMoV apresentou ligeira diferença de sequência, tendo sido encontrada no contexto G_2AGA_5 . Atualmente, existem poucas evidências experimentais disponíveis para a presença e funcionalidade da proteína conhecida como PIPO, por esta razão, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de tradução envolvidos na expressão de PIPO, bem como, o seu real papel no ciclo de vida dos potyvírus. Contudo, estudos, recentes têm sugerido que esta proteína seja essencial no movimento das partículas virais dentro da hospedeira (Wei *et al.*, 2010; Wen & Hajimorad, 2010).

Com base na sequência completa do genoma, PepMoV foi confirmado como o potyvírus mais estreitamente relacionado dentre todos os já sequenciados, com 63,72% de identidade nucleotídica, seguido por WPMV com 62,17% de identidade nucleotídica. PepMoV exibiu também a maior identidade nucleotídica com BsMoV para as regiões codificantes de CI (69,78%) e NIb (71,54%) (Tab. 2), as quais são as principais regiões para a avaliação taxonômica em potyvírus (Adams *et al.*, 2005b). De acordo com os critérios de demarcação de espécies, BsMoV partilha valores de identidade nucleotídica muito abaixo dos limiares de 78,2%, 77% e 76% para as sequências de CI, CP e do genoma completo e, portanto, representa verdadeiramente um nova espécie dentro do gênero *Potyvirus* (Adams *et al.*, 2005b).

Nas análises filogenéticas da sequência genômica completa, a longa distância entre BsMoV e PepMoV confirma que são espécies distintas, contudo, agrupam-se em um ramo bem definido com PepMoV, PTV, PVV e WPMV (Fig. 18). Constituído por espécies que, assim como BsMoV, ocorrem em países da América do Sul, sugere-se que os membros deste grupo tenham evoluído a partir de um ancestral comum.

Plantas de *Brugmansia* e *Datura* são amplamente cultivadas como plantas ornamentais e em algumas regiões tropicais são consideradas plantas daninhas, porém, relatos de potyvírus nessas solanáceas são raros. O único exemplo conhecido é o *Colombian datura virus* (CDV), o qual é pouco estudado, e, por isso, estudos comparativos com BsMoV não puderam ser realizados. A importância econômica e a distribuição de BsMoV dentro de plantas cultivadas ou silvestres no Brasil ainda precisa ser determinada, mas a fácil infecção de solanáceas como plantas de tomate e fumo após inoculação mecânica, sugere o potencial impacto que este vírus poderá causar se, por alguma razão, tornar-se amplamente distribuído em solanáceas cultivadas.

Esse trabalho é o primeiro a apresentar a sequência completa de um vírus que infecta a ornamental trombeta no Brasil, caracterizado também em nível biológico, sorológico e microscópico (Lucinda *et al.*, 2008). Com a completa caracterização deste vírus, é possível confirmar a existência de um novo vírus pertencente ao gênero *Potyvirus*, o *Brugmansia suaveolens mottle virus* (BsMoV), assim, denominado.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os membros do gênero *Potyvirus*, um dos grupos de maior importância econômica para as culturas agrícolas, representam ca. 16% de todos os vírus de plantas conhecidos. Responsáveis por prejuízos significativos na agricultura mundial, os potyvírus, provocam doenças em quase todas as culturas comerciais, por esta razão, têm sido mobilizados esforços em pesquisas que envolvam o estudo deste grupo de fitovírus.

Estudos prévios de caracterização biológica e molecular de BsMoV, isolado de *Brugmansia suaveolens*, revelaram que este apresentava propriedades distintas daquelas já descritas na literatura para outros potyvírus. Em razão da disponibilidade parcial de sua sequência genômica e, devido ao fato deste vírus ter sido capaz de causar sintomas severos em testes com plantas susceptíveis sendo, inclusive, capaz de infectar plantas de tomate, demonstrou a importância em potencial desse vírus e justificou a realização da sua completa caracterização.

Desta forma, em razão de não haver relatos de completa caracterização de potyvírus infectando *B. suaveolens*, acredita-se que este seja o primeiro trabalho a apresentar a sequência completa de um vírus que infecta a ornamental trombeteira no Brasil, o qual foi previamente caracterizado em nível biológico, sorológico e microscópico.

Com a completa caracterização deste vírus, foi possível confirmar a existência de um novo vírus pertencente ao gênero *Potyvirus*. As particularidades desse vírus tornam-o interessante para a realização de estudos futuros de avaliação de genes relacionados à patogenicidade, à supressão de silenciamento gênico, bem como a sua utilização como vetor viral.

Os resultados descritos nessa dissertação foram compilados e re-organizados na forma de um trabalho científico que foi publicado na revista Archives of Virology (Anexo B).

REFERÊNCIAS

- Adams, M. J., Antoniw, J. F. & Beudoin, F. (2005a).** Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Mol Plant Pathol* **6**, 471-487.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F. & Fauquet, C. M. (2005b).** Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch Virol* **150**, 459-479.
- Agrios, G. N. (2005).** *Plant Pathology*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Alves, M. N., Sartoratto, A. & Trigo, J. R. (2007).** Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): defense, allocation, costs, and induced response. *J Chem Ecol* **33**, 297-309.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. & Vance, V. B. (1998).** A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13079-13084.
- Andreola, B., Piovan, A., Da Dalt, L., Filippini, R. & Cappelletti, E. (2008).** Unilateral mydriasis due to Angel's trumpet. *Clin Toxicol (Phila)* **46**, 329-331.
- APGIII (2009).** An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**, 105-121.
- Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1993).** Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11919-11923.
- Atreya, C. D., Raccach, B. & Pirone, T. P. (1990).** A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* **178**, 161-165.
- Atreya, P. L., Lopez-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1995).** Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J Gen Virol* **76 (Pt 2)**, 265-270.
- Barg, D. G. (2004).** Plantas tóxicas.
- Bennett, B. C. (1992).** Hallucinogenic plants of the Shuar and related indigenous groups in Amazonian Ecuador and Peru. *Brittonia* **44**, 483-493.
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M. & Couturier, M. (1994).** Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* **148**, 71-74.
- Blanc, S., Lopez-Moya, J. J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. (1997).** A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**, 141-147.
- Bruneton, J. (2001).** *Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales*. Zaragoza: Acribia.
- Capasso, A. & de Feo, V. (2003).** Alkaloids from *Brugmansia arborea* (L.) Lagerhein reduce morphine withdrawal in vitro. *Phytother Res* **17**, 826-829.
- Carrington, J. C., Cary, S. M., Parks, T. D. & Dougherty, W. G. (1989).** A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *Embo J* **8**, 365-370.

- Carrington, J. C., Freed, D. D. & Oh, C. S. (1990).** Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *Embo J* **9**, 1347-1353.
- Carrington, J. C., Haldeman, R., Dolja, V. V. & Restrepo-Hartwig, M. A. (1993).** Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus in vivo. *J Virol* **67**, 6995-7000.
- Carrington, J. C. & Herndon, K. L. (1992).** Characterization of the potyviral HC-pro autoproteolytic cleavage site. *Virology* **187**, 308-315.
- Carstens, E. B. (2010).** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch Virol* **155**, 133-146.
- Chung, B. Y., Miller, W. A., Atkins, J. F. & Firth, A. E. (2008).** An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5897-5902.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C. & Carrington, J. C. (1995).** Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549-559.
- de Feo, V. (1992).** Fitoterapia medicinal and magical plants on northern Peruvian Andes. *Fitoterapia* **63**, 417-440.
- Dequech, S. T. B., Sausen, C. D., Lima, C. G. & Egewarth, R. (2008).** Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. *Biotemas* **21**, 41-46.
- Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A. & Carrington, J. C. (1995).** Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**, 1007-1016.
- Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G. & Carrington, J. C. (1994).** Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *Embo J* **13**, 1482-1491.
- Domier, L. L., Shaw, J. G. & Rhoads, R. E. (1987).** Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* **158**, 20-27.
- Dougherty, W. G. & Hiebert, E. (1980).** Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* **104**, 174-182.
- Dougherty, W. G., Parks, T. D., Cary, S. M., Bazan, J. F. & Fletterick, R. J. (1989).** Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase. *Virology* **172**, 302-310.
- Dusi, A. N. & Carvalho, M. G. (1988).** Purificação e imunogenicidade da proteína capsidial do vírus do mosaico comum do feijoeiro (VMCF). *Fitopatologia Brasileira* **13**, 252-255.
- Edwardson, J. R. (1966).** Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *Am J Bot* **53**, 359-364.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. (2005).** *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Academic Pres.
- Firth, A. E. & Brown, C. M. (2005).** Detecting overlapping coding sequences with pairwise alignments. *Bioinformatics* **21**, 282-292.
- Firth, A. E. & Brown, C. M. (2006).** Detecting overlapping coding sequences in virus genomes. *BMC Bioinformatics* **7**, 75.

- Gal-On, A. (2000).** A Point Mutation in the FRNK Motif of the Potyvirus Helper Component-Protease Gene Alters Symptom Expression in Cucurbits and Elicits Protection Against the Severe Homologous Virus. *Phytopathology* **90**, 467-473.
- Gotz, R., Huth, W., Lesemann, D. E. & Maiss, E. (2002).** Molecular and serological relationships of *Spartina* mottle virus (SpMV) strains from *Spartina spec.* and from *Cynodon dactylon* to other members of the Potyviridae. *Arch Virol* **147**, 379-391.
- Greene, G. S., Patterson, S. G. & Warner, E. (1996).** Ingestion of angel's trumpet: an increasingly common source of toxicity. *Southern Medical Journal* **89**, 365-369.
- Griffin, W. J. & Lin, G. D. (2000).** Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* **53**, 623-637.
- Grynkiewicz, G. & Gadzikowska, M. (2008).** Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacol Rep* **60**, 439-463.
- Hall, J. S., Adams, B., Parsons, T. J., French, R., Lane, L. C. & Jensen, S. G. (1998).** Molecular cloning, sequencing, and phylogenetic relationships of a new potyvirus: sugarcane streak mosaic virus, and a reevaluation of the classification of the potyviridae. *Mol Phylogenet Evol* **10**, 323-332.
- Havelius, U. & Asman, P. (2002).** Accidental mydriasis from exposure to Angel's trumpet (*Datura suaveolens*). *Acta Ophthalmol Scand* **80**, 332-335.
- Hull, R. (2002).** *Matthews' Plant Virology*. San Diego: Academic Press.
- Ilmberger, N., Willingmann, P., Adam, G. & Heinze, C. (2007).** A Subgroup 1 Tobamovirus Isolated from *Brugmansia* sp. and its detection by RT-PCR. *Journal of Phytopathology* **155**, 326-332.
- Isbister, G. K., Oakley, P., Dawson, A. H. & Whyte, I. M. (2003).** Presumed Angel's trumpet (*Brugmansia*) poisoning: clinical effects and epidemiology. *Emerg Med (Fremantle)* **15**, 376-382.
- Kadare, G. & Haenni, A. L. (1997).** Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* **71**, 2583-2590.
- Kahn, R. & Bartels, R. (1968).** The Colombian *Datura* Virus – A New Virus in the Potato Virus Y Group. *Phytopathology* **58**, 587-591.
- Kasschau, K. D., Cronin, S. & Carrington, J. C. (1997).** Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* **228**, 251-262.
- Kekarainen, T., Savilahti, H. & Valkonen, J. P. (2002).** Functional genomics on potato virus A: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation. *Genome Res* **12**, 584-594.
- Kissmann, K. G. & Groth, D. (1997).** *Plantas infestantes e nocivas*. São Paulo: Basf.
- Knuhtsen, H., Hiebert, E. & Purcifull, D. E. (1974).** Partial purification and some properties of tobacco etch virus induced intranuclear inclusions. *Virology* **61**, 200-209.
- Lain, S., Riechmann, J. L., Martin, M. T. & Garcia, J. A. (1989).** Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene* **82**, 357-362.
- Langenberg, W. G. & Zhang, L. (1997).** Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J Struct Biol* **118**, 243-247.

- Liang, W. X., Song, L. M., Tian, G. Z., Li, H. F. & Fan, Z. F. (2006). The genomic sequence of Wisteria vein mosaic virus and its similarities with other potyviruses. *Arch Virol* **151**, 2311-2319.
- Lopez-Moya, J. J., Wang, R. Y. & Pirone, T. P. (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J Gen Virol* **80 (Pt 12)**, 3281-3288.
- Lorenzi, H. & Souza, H. M. (2008). *Plantas ornamentais do Brasil*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.
- Lovatto, P. B., Goetze, M. & Thomé, G. C. H. (2004). Efeito de extratos de plantas silvestres da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. acephala). *Ciência Rural* **34**, 971-978.
- Lucinda, N., Nagata, T., Inoue-Nagata, A. K., Salaroli, R. B. & Kitajima, E. W. (2008). Brugmansia suaveolens mottle virus, a novel potyvirus causing leaf mottling of Brugmansia suaveolens in Brazil. *Arch Virol* **153**, 1971-1976.
- Monger, W. A., Spence, N. J. & Foster, G. D. (2001). Molecular evidence that the aphid-transmitted Tomato mild mottle virus belongs to the Potyviridae family but not the Potyvirus genus. *Arch Virol* **146**, 2435-2441.
- Muccillo-Baisch, A. L., Parker, A. G., Cardoso, G. P., Cezar-Vaz, M. R. & Soares, M. C. (2010). Evaluation of the analgesic effect of aqueous extract of Brugmansia suaveolens flower in mice: possible mechanism involved. *Biol Res Nurs* **11**, 345-350.
- Murphy, J. F., Klein, P. G., Hunt, A. G. & Shaw, J. G. (1996). Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* **220**, 535-538.
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F. & Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* **57**, 1159-1181.
- Parker, A. G., Peraza, G. G., Sena, J., Silva, E. S., Soares, M. C., Vaz, M. R., Furlong, E. B. & Muccillo-Baisch, A. L. (2007). Antinociceptive effects of the aqueous extract of Brugmansia suaveolens flowers in mice. *Biol Res Nurs* **8**, 234-239.
- Pirone, T. P. & Blanc, S. (1996). Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 227-247.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. & Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* **8**, 3867-3874.
- Riechmann, J. L., Lain, S. & Garcia, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* **73 (Pt 1)**, 1-16.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S. & Casse-Delbart, F. (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N Strain) genomic RNA. *J Gen Virol* **70 (Pt 4)**, 935-947.
- Rodriguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T. P. & Shaw, J. G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J Gen Virol* **74 (Pt 9)**, 1945-1949.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. & Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-295.
- Salamon, P. & Palkovics, L. (2005). Occurrence of Colombian datura virus in Brugmansia hybrids, Physalis peruviana L. and Solanum muricatum Ait. in Hungary. *Acta Virol* **49**, 117-122.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001).** *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaad, M. C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S. & Carrington, J. C. (1996).** Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* **70**, 7039-7048.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. & Carrington, J. C. (1997).** Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *Embo J* **16**, 4049-4059.
- Shiboleth, Y. M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S. A., Gaba, V. & Gal-On, A. (2007).** The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J Virol* **81**, 13135-13148.
- Shukla, D. D., Ward, C. W. & Brunt, A. A. (1994).** *The Potyviridae*. Wallingford, UK: CAB International.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (2007).** *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: UFSC.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H. (2008).** *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. SP: Instituto Plantarum de Estados da Flora: Nova Odessa.
- Staden, R., Judge, D. P. & Bonfield, J. K. (2003).** Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In *Introduction to Bioinformatics: A Theoretical and practical approach*. Edited by S. A. Krawetz & D. D. Womble. Totawa: Human Press Inc
- Susaimuthu, J., Tzanetakis, I. E., Gergerich, R. C. & Martin, R. R. (2008).** A member of a new genus in the Potyviridae infects Rubus. *Virus Res* **131**, 145-151.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L. & Bernardi, F. (2001).** Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* **74**, 157-175.
- Verchot, J., Herndon, K. L. & Carrington, J. C. (1992).** Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* **190**, 298-306.
- Verchot, J., Koonin, E. V. & Carrington, J. C. (1991).** The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* **185**, 527-535.
- Verhoeven, J. T. J., Jansen, C. C. C. & Roenhorst, J. W. (2008).** First report of pospiviroids infecting ornamentals in the Netherlands: Citrus exocortis viroid in Verbena sp., Potato spindle tuber viroid in Brugmansia suaveolens and Solanum jasminoides, and Tomato apical stunt viroid in Cestrum sp. *Plant Pathology* **57**, 399-399.
- Wang, X. & Gillam, S. (2001).** Mutations in the GDD motif of rubella virus putative RNA-dependent RNA polymerase affect virus replication. *Virology* **285**, 322-331.

- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., Zhou, X., Carrington, J. C. & Wang, A. (2010).** Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* **6**, e1000962.
- Wen, R. H. & Hajimorad, M. R. (2010).** Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* **400**, 1-7.
- Wink, M. (1988).** Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* **75**, 225-233.
- Wu, F. & Tanksley, S. D. (2010).** Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *Bmc Genomics* **11**, 182.
- Xiong, Y. & Eickbush, T. H. (1990).** Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *Embo J* **9**, 3353-3362.
- Zambolim, L., Vale, F. X. R. & Costa, H. (2000).** *Controle de Doenças de Plantas – Hortaliças*. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora.
- Zayed, R. & Wink, M. (2004).** Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Z Naturforsch C* **59**, 863-867.

ANEXO A

1 aaaattaaaa cattacataa caaattatac gaaagcattc aagaaatcaa gcaatcgatt
 61 tccaagcatt cagcaattac tagtaaacia cacgtcattt tgaattactg cacttttgtgta
 121 ccaactactc aagtcttttaa atattttctc gcactttcac tacaacattt ccgtacatca
 181 atcatcaatg gcattcctta tcccaaacat catgttcggt gactttatgt gctcacagga
 241 tgggcagggc tgcacocctac tgaaggagag gcctctaact gcaccacctg ctgctctaata
 301 ggcaccaatg ccatcaaaac caaaggaagt gaaaaagggtg gacccttttg caaaacttga
 361 gcaaaagctg gcgccatacc tagagaagcg tgcactggcg aaggttcgaa agggacccaa
 421 tggtttgccta ctctatagga aaccactga aaccgcatac caacgccatt taaccaaaaa
 481 ggagagggtta aggagagagg aactcgcggt tcaaaacgcc gatccttact tagtgacaaa
 541 aattgtcatt gctgggggag agaaagtgac cccaacaaat atcaatgtgg gaccaaagaa
 601 accattgaac aagaccctt caatgaagaa gaagggtgca tacaagggtcc caacgataac
 661 aatggaaaaa cttgactggc tgatccgtca agttaagaac attgcaattg aaaataacct
 721 caaaatagag gttattggga gaaagaagca caaaataaga tatgcatctc ataagaacia
 781 accaattgca tgtcttcacc taccacacat ggatggagtt aagaaggcta gggagtgag
 841 attacacgac catgaagcac aatcatatc cattcttgcc aatacaca catttggtgc
 901 aagaatttg gataaacatt tggaaacaagg gactagtgga ttcacttca atggtgaatt
 961 gtgttggtga cagtttggtta ggtgtaaaaa tggaaatggtt atagtccgag gcagattgga
 1021 tggcatgatg gtggatgcac aatcaaaagt gtcatatcat gtaatgcac gaatgcacca
 1081 ttactcaacc tcatcaactt tttgggatgg actcgaatca caatggaagc gaatgcgacc
 1141 tagcaaggat catgtttgtg aacctacata tccaataaag aaatgtggag aagttgcagc
 1201 gattttaact caggtgttaa atccatgcta caagatgaca tgtggctctt gctctgctaa
 1261 aatcaatgaa acaacattaa gtgagcacgt gtgcaacatc catacagctg caacagttgg
 1321 atattatcac atgcaagagg tggcccctga gtttacacac gttacaaaat tactggaagt
 1381 tctcattgat ctaacagata gtaaggggtga tgcaacacca atctttgaga aaattcacia
 1441 gatgattggc tcaaaaacac aaagtccatt cactcatcta aaccaattaa atgaattctt
 1501 cctgaagggc tgtgaaaaca aaggagatga ttggatcaaa gcaagagata gtttgcttga
 1561 attgtcacga ttccaaaaga accgaactga caacatcagc aaagggtgata ttgggtcttt
 1621 tagaaataaa atgtcgtcaa aggcacacta taattactat ctgtcttgcg acaaccagtt
 1681 ggacaaaaat gcaaatctc tatgggggtca acgggaatat catgcaaac ggttcttttc
 1741 tgatttcttt tcagtaattg atcctgagtt aggttatgaa aactgggcaa tccgaaagaa
 1801 cccaaatggt gagaggaagt tatcaattgg aaacttaatt gtaccacttg atctaattga
 1861 atttagaaag aaaatgtgtg gtgaagatac aaaccaacca ctggttggta aacagtgtgt
 1921 gagcatgaag gattccaact tcttgtagcc ttgttggtgt gtcacacgtg acgatgggag
 1981 tgctgtttta tccacatttt atgcaccaac caaaaagcac ttggtaattg gaacaacagg
 2041 ggatcaaaag tacgtggatc taccaaaggg agaactctgag tctttataca tagcaaaagg
 2101 tggttattgc tacataaatt tgtttctagc tatgttaata aacatcaggg aggaggatgc
 2161 aaaagacttc accaaaaagg tcagagattt gattataccc agacttggtg agtgggcaac
 2221 actccttgat gtggcaacca catgtgcca actcagaatc ttcttcccag atatacatga
 2281 tgcagagttg ccacgcattt tagtagatca caacacaaaa acttgccatg ttgtggactc
 2341 atttgatca attagtgcag gctaccatat tttgaaagca gcaacagtag cacagttagc
 2401 tctctttgct gatgatgcac tggattctga aatgaaacat tacttggtag gtggaagttc
 2461 aagtgatgga gaatacacac caattccaac tgaagagggtg aaagtaactg ttctctcga
 2521 accaagattg tgcgggatta atgagcatca agcagttaca cttctcctca agggcattta
 2581 taagaggaat gtaatgaagg agcttctgat ggatgaacct tacataatgt tgttctcaat

2641 tttatcacca tcagtcttag ttgccatgta tgacaatcgt gcatttgaac aggcaattaa
 2701 catatggatc aataaagacc aatcaatagc tctcatagca accattctct caaacttagc
 2761 agagaaagtg tcttttagctg aaacactaac tcgacaaact ctgctaattg aaaattctgc
 2821 tgagcagtta atggatgcta cattcagagg ttttcaattg agcctggctt acaatgcttc
 2881 tgttgatctc atcaccaate ttcgagagaa ggcaagaagc aattgtgagc taacgaaggg
 2941 tggatatact gatgcaagta acgactttgc tgagtcaatg gagaaaaatt atcaaagtct
 3001 cttgcaaacc cactggaacg agctaagttg gcgggaaaga ttatcagctt attggttctc
 3061 aagaaagcaa aagagacaat taacaaaact tttgcgaaaa gaaagaaccg ccaatthgag
 3121 aggtgtgttc gaatactcac caaagccgca tatcatacaa cttgctcatc tcaccaaac
 3181 aaagatggat ggtgctgttc gtgtgacaaa aggttatatt gacaacaagt gtgtccacat
 3241 gaagtcctac atgttcagca cattgctcaa cagacttccc aatgctaaaa tcatcatcag
 3301 tagtgtcttc ataatcggag ctctattgaa tatggcaggg acgatgaatt tctttataac
 3361 tgaacatgaa aacaataagg cagctgttgc aaggatggca ttatgggatc aagaaaacgc
 3421 ttgccatgaa ttgtatacag cacttgagcg aaagctggga caacgaccat cgtgggatga
 3481 atattgtgaa tatgttaata aaaccaatcc atcccctcgt gagttcattg aaaagaatta
 3541 caattgtgat aatgtggcac accagagatc aactcctgac ttaaagaagc ttgagcacat
 3601 aatagcattt acatcattgc taataatgct atttgatact gagaggagtg attgtgtatt
 3661 taaatccttg aataaattca aaggacttgt gagttcaatg gactcagatg taaggcatca
 3721 atcccctggat gacatagtca acaacttggg ggataaaaa atgacaattg actttgaact
 3781 tgatgatgat gtccatcaaa ccatttcagg gattgataca acatttggaa aatggtggga
 3841 cacacaagtt gaaaaaggct ttatcattcc acattacaga acagagggtt tgttcatgga
 3901 attcaccaga gatacagctg caaaagtcgc gagtgatatt tccatctcaa catccactga
 3961 ctttctgatt cgtggagctg ttggatcagg gaaatcaaca ggactacat accatctcag
 4021 tcaatctggc tctgttctgt taattgaacc aacaagacca cttgcagaaa atgtgtacaa
 4081 acaattgtca ggtggacat tctaccaaaa accaacactt cgaatgagag gtaatagtgt
 4141 gtttggctca tccccaatca gtgttatgac cagtggcttt gcattacact attatgcaa
 4201 caacttgcag cagttacagg aatccgata tatcattatt gacgaatgtc atgtgttggg
 4261 tgcactctgct atggctttta ggagttaat ccatgcatat catggacatg ctaaagtat
 4321 aaaggtctct gcagcaccac caggaagaga agtagaattc actactcaat acccagtaaa
 4381 acttgttgtt gaggaatcat tatcattcaa acactttggt gaagcccaag gaacggcaac
 4441 taattgagc atgatccagc atggtaacna tctcctcgtt tatgttgcta gttacaatga
 4501 ggtggaccag ttgtcaaagc tcttaacaaa cagaggcttc atggtaacaa aagtggatgg
 4561 aagaacaatg aaacatgggtg atttagaaat catcacaaaa ggtaccaaaag agaaaccca
 4621 cttttagtga gcaacaaaca ttattgaaaa tggagtgaca ctggatattg atgttgttgt
 4681 cgactttggc caaaaagtga gcccatatct tgatattgac aatagatcca ttgcatacaa
 4741 taaagtgtca ataagttatg gagaacggat tcagagattg ggtagagttg ggagaatcca
 4801 aaaaggtaca gccttacgaa ttggatacac tgagaagggg ttaattgaaa taccaccaat
 4861 gatatcaact gaagcagcct tatactgttt tgcttacaat ttaccagtga tgtcaagcgg
 4921 ggtaacaaca agcttgttat caaagtgcac aataaaacag gtccgagtta tgcacaatth
 4981 tgagttgaat ccattcttca cattcaatth tgtagctcat gacggaacca tgcaccagc
 5041 aattcatgaa gttttgaaga aatataagct acgagactca gtgattccat taagtgagag
 5101 ctctattcca taccgagcct caagtgactg gttggacgta gctgattatg cncgagttgg
 5161 ggttaagctg gattgtgaag agaagacaaa aatthctthc cacatcaagg atataccggc
 5221 tcggctacat gaaaaattgt gggaaactgat cttaaaatth aaacatgtg ctgcattccc

5281 aacaattaaa acagcttcca tatcaaagat tgcttacct ctgagtactg atctttttgc
 5341 tattccacga acattgggct tgattgaaaa cctcatcgag gatgagagga ttaaacaata
 5401 tcaatataag agcttaattg acagtggatg ttctagtatg ttctcgatag tgggtttaac
 5461 caactcacta cgggcgcgat atacaaagga tcatacatct gagaacatta ggaaactgga
 5521 agcagtaaag gcacaattaa tgggaatttca caacttaagt ggttcaaggg atgaagtgaa
 5581 tttattgaag aagtttgaat cactccagtt tgtgcaacac cagaacaaga actcattggc
 5641 atctgctctg caactcaaag gtttgtggaa gaaatcgctt gctgcgagag atattattat
 5701 tgcttgtggg gtgctcgggt gcggtatttg gatgctatat gaaatcttca gaggtaagat
 5761 ggaaaaagtc acccatcaag gaatgagcaa gagtaagaag attaaggcct tgaaattccg
 5821 caaagcacgg gacaaaaggg caggatttga gatagatgca aatgaagaca ccctggaaga
 5881 gtattttggg tctgcgata caaagaaggg taaagggaaa ggaacaactg ttgggatggg
 5941 aagaaccaac agaaagtttg taaacatgta tgggtttgaa ccaggacaat actcatacat
 6001 caaatgtgtt gaccctttaa ctggtgcaca gattgatgat aatgtgtacg cggatatttt
 6061 agatattcaa aggcaatttg gtgaaatccg agatcaaaaa gttttggatg aagaactgga
 6121 acaccaacac atccgcatga aaccagggat tgaagcctac tttattaaag attggacaac
 6181 aaaagcatta aagattgacc tcacaccaca caatccatta cgtgtgagtg acaaagcaag
 6241 ttcaatcatg aaataccag agagagaatc agagttgaga caaacaggac cacctcaaga
 6301 agtcgatctc aaagatctcc cacacctgga agttgagcat gaggcaaaag cattgttaaa
 6361 aggtctacga gactacaacc ctattgctca aacaatttgt agactcacag tatcatctga
 6421 agagggatcc atgtccacat atgggttagg ttttggggga ttaattgtag ctaaccacca
 6481 cctgtttcgc agctttaatg gttcaatgga agtgaaatca catcatggct tgtttcgc
 6541 tccaaattta atggtgctca acattcgccc aattaaagga aaggacataa tagtaataaa
 6601 gatgccaaag gatttcccac cctttcctca gaagttaaag tttaggagtc caaaagagga
 6661 agatagagtt acactcatcg gctcaaattt tcaggagaaa tttatttctt caacaatatc
 6721 agagacgagt gcaacacatc ctggtgctag aagctctttt tggaaacact ggatatcaac
 6781 agatgatgga cattgtgggt taccaatggt gagcagttat gatggatatg tagtaggcct
 6841 ccatagctta acaataacta ggaacagtga gaactactac acagcatttg atgatgattt
 6901 cttaaatgaa tacttgctca caccatcaaa tgttgaatgg gttaagaact ggaaatataa
 6961 tcccagtagt gtactttggg gatcattaaa gttgacacag gacaccccat ctggaatggt
 7021 caaaacaacg aagatgattg aggacctggt tgcttatcaa gagaatttag tacgagagcg
 7081 aggaagaaag tcatcttgga tgatggatgc tttgaaagat aacttgggtg ctattgcata
 7141 catgaagagt caattggtat caaacatgt tgtaaaggga gaatgtcgat attttgcaca
 7201 gtacttagaa caagatgcaa ctgcaaaaac attctttaa cactcatgg atgcatatgg
 7261 aatgagttta ttgaataagg aggcataatat aaaggatggt atgaagtact caaagcctct
 7321 tgacattggg ttagtggtt gcaatgcttt tgagaaatca gttgtcaggg tgataacata
 7381 cctccagctg aagggatttc gccaatgcac atttgtcaca gatgaggaag aaatattcaa
 7441 agcactgaat atgaacactg cagtaggtgc aatgtatgga ggaaagaaaa aggactactt
 7501 tgatggatac accagtgaac agaaggaaca aatcttgagg gagagttgtc tcagattata
 7561 taagggacaa ctaggtgtat ggaacggatc actgaaggca gaattaaggc caatggaaaa
 7621 gattaaagag aacaaaacaa ggtcttttac agcagcacca ctcgacaccc tacttgggtg
 7681 gaaggtttgt gttgatgatt tcaacaatca attttactcg aaaaacatcg agtgctgttg
 7741 gtcagttgga atgacaaagt tctatgggtg gtggaataaa ttgctaactg ctctaccgga
 7801 aggatgggtt tattgtgatg ccgatggatc tcagtttgat agttctttga cccttatct
 7861 gatcaatgca gttcttgcta ttagatgtac atttatggaa gattgggaca taggacacaa

7921 gatgttggag cacctataca cagaaataat ctacactcca atatctactc cggatggaac
7981 aatcattaaa aagtttaaag gaaacaacac aggtcaacca tccacggttg tggataattc
8041 actgatggtg gtacttgcaa tgaattatgc ttttgaaaaa gaaggatta gtgaaaaaga
8101 aatagactca gtttgcaagt tctttggtta tggtgatgat ctcttgattg ctattaacct
8161 agctcatgaa tccatgctgg atcgtcttca ggcacacttc tcagaactcg gattgaatta
8221 tgacttctca tcacgaactc gtgataaaac aaagttatgg ttcattgtccc actgcggaat
8281 ttcagttgaa ggtatgtata taccaaaatt ggaagaagag agaatcgtgt ctattctaca
8341 atgggataga gctgtgatac cagaataccg acttgaagcc atttgtgcag caatgattga
8401 atcgtggggt taccacaac taacaaatga gatcagaaga ttttatagtt ggttgattga
8461 acaagagcca tttgcacaat tggcagcaga agggagggcc cttacatca gtgaaactggc
8521 cttaaagaag ttatatctga acaccacaat cgaaagtcac gaattggaag cttacatgca
8581 aacatttgca caatttgatg aagactttga atgtggatgt tatgaggtag gtcacagag
8641 cacaacttca acaccagcga tagatgctgg aaaagaggca aaggagaaaa gtgtcgcaat
8701 gcctccggca caaacaagaag aaaccactag tagttcaaaa ccaagagatg cggatgtgaa
8761 tgctggaact agtggacat attctgtacc aagaataaaa gcaatatcaa ataaaaatgag
8821 aatgcccaga agcaaaaata atgctgttct aaacttagaa cacttacttg aatataagcc
8881 aagtcaattg gatatctcga atacaaggtc aacacaaagt caatttgaca tttggtattc
8941 ggaagtccaa aaagcatatg atatacaaga ggctgagatg ggtactgtca tgaatggatt
9001 gatggtttgg tgcattgaga atggaacttc accaaatata agtggagatg ggacaatgat
9061 ggacaaagac gagcaggctg aatttccact aaagcccgtc attgaaaatg ctaagcccac
9121 ttttcgcaa atcatggcac atttttctga tgttgcaaaa gcatacatag agatgcgaaa
9181 caagaatgaa ccatatatgc cacgatatgg tttagttaga aatttaaggg atatgagcct
9241 ggctcgatat gcttttgact tttatgaggt cacatcccga acatccgtcc gagctcgca
9301 agcccacatt caaatgaagg ctgcagcact gaaatctaca caatttaa at tgtttggatt
9361 ggatggtggc attggaacac aagaggaaaa cacagagcgg cacaccactg aagacgtgag
9421 ccccaatatg catacactgc ttggggtcag aaatacttaa tctgaagacc gctcctgacg
9481 atatataata taatatatat gcagtattat atttggcttt tcctgttcta gtctatttcc
9541 tacccttata gtaatcatat caaggcaaac actatgattg tgagttctaa gcgaggggtg
9601 ccctccgaat tcccagttgt ggttaaggtc gtagtatggt gtaccagcga ggttatacct
9661 ccgagattat ttggaagggc ttctgcgaca cactcacaga ggatgatcct tgtagtctct
9721 ttactatata ccagaaagaa atagaatctc tgctaggttt agaggggctc tatatagaga
9781 cagatggcac gtgtcgttgg tggagacgta aatcatgtgt ggcgtagtc tttatgtagt
9841 ggatgatcga cggcctttcg tagagagacc

ANEXO B

Complete genome sequence of *Brugmansia suaveolens* mottle virus, a potyvirus from an ornamental shrub

Natalia Lucinda · Alice K. Inoue-Nagata ·
Elliot W. Kitajima · Tatsuya Nagata

Received: 14 June 2010 / Accepted: 2 September 2010 / Published online: 15 September 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract *Brugmansia suaveolens* mottle virus (BsMoV) was the first potyvirus isolated from “angel trumpet” (*Brugmansia suaveolens*), described in Brazil. In this study, the complete nucleotide (nt) genome sequence of BsMoV was determined, and the deduced amino acid (aa) sequence was analyzed. The BsMoV RNA genome consists of 9870 nt without a poly-A tail, encoding a putative typical potyviral polyprotein of 3090 aa. Pairwise comparisons of the complete BsMoV genome with those of the most closely related potyviruses revealed a maximum nucleotide identity of 63.7% with pepper mottle virus. These results and phylogenetic analyses based on the complete genome sequence of the most closely related potyviruses confirmed that BsMoV should be considered a member of a distinct species of the genus *Potyvirus*.

Introduction

Brugmansia suaveolens plants are ornamental shrubs, also known as “angel trumpet”. Some plants showing symptoms of mottling on their leaves were found during an inspection in the medicinal plant collection of the Instituto

Agronômico de Campinas, SP, Brazil. The hypothesis of a possible viral etiology was confirmed by preliminary studies with the isolate Bs-Campinas. The causal agent was identified as a potyvirus, provisionally designated *Brugmansia suaveolens* mottle virus (BsMoV), based mainly on the nucleotide sequence of the coat protein gene [10]. The objective of this study was to determine its complete nucleotide sequence, analyze its predicted proteins and determine its relationship to other potyviruses.

Provenance of virus material

B. suaveolens leaves showing mottling were used as the original source of inoculum (isolate Bs-Campinas) [10]. BsMoV-inoculated samples of *N. tabacum* leaves showing symptoms were collected and used for total RNA extraction with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described in the manufacturer’s instructions. The first-strand cDNA was synthesized using the oligodT50PacIM4 (5′-TCA GCA CTG ACC CTT TTG AAT TAA TTT₅₀-3′) primer using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The primer 1680For (5′-TGT GGG GAC AGA GGG AAT ATC ATG-3′), which annealed in the conserved region of the HC-Pro gene, was used for PCR in combination with the M4 reverse primer [5]. A cDNA fragment of ca. 8 kb was obtained by PCR using Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) and, after gel purification, cloned into the pCR4 vector (Invitrogen). The 5′ end of the genome of BsMoV was amplified using a 5′ RACE System kit (Invitrogen) with GSP2Rev (5′-CCT AAC TCA GGA TCA ATT ACT G-3′) and anchor primers following the manufacturer’s instructions. The PCR products were then cloned into the pCR2.1 vector (TA Cloning Kit, Invitrogen). Two clones were selected, and the inserts

N. Lucinda · T. Nagata (✉)
Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília,
70910-900 Brasília, DF, Brazil
e-mail: tatsuya@unb.br

A. K. Inoue-Nagata
Embrapa Hortaliças, Caixa Postal 218,
70359-970 Brasília, DF, Brazil

E. W. Kitajima
Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia
Agrícola, Escola Superior de Agricultura, Luiz de Queiroz,
Caixa Postal 9, 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil

were sequenced completely by “primer walking”. A consensus sequence was assembled using the Staden 4.0 software package [13], and the final genome sequence was deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank database under the accession number AB551370. Twenty-eight complete genome sequences of related potyviruses were used for phylogenetic analysis. The sequences were aligned using ClustalW [15] with default parameters, and pairwise genetic distances between sequences were calculated using DNAMAN 4.0 (Lynnon Corporation, Quebec, Canada) with the pairwise alignment parameters gap open penalty = 10; gap extension penalty = 5; 40% delay of divergent sequences. Neighbor-joining phylogenetic trees were prepared using MEGA 4.0 [14] with 1,000 bootstrap replicates, and pairwise evolutionary distances were calculated with a maximum composite likelihood nucleotide substitution model.

Sequence properties

The complete genome of the Bs-Campinas isolate consisted of 9870 nucleotides, excluding the 3' terminal poly(A) tail (Fig. 1), with 187 nt at the 5' non-translated region (NTR) and 409 nt at the 3'NTR. A typical potyviral genome organization was predicted from the sequence. A large open reading frame (ORF), starting at position 188 with an AUG sequence and terminating at position 9457 with an ochre stop codon, was identified. The putative translation product contained 3090 amino acids (aa), with a calculated molecular mass of 351,249 kDa (http://ca.expasy.org/cgi-bin/pi_tool). According to the conserved cleavage sites predicted by Adams et al. (2005) [1], a total of ten proteins is expected: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb and CP (Fig. 1). The P1/HC-Pro junction is cleaved by the P1 serine protease at its carboxy terminus (MHHY/STSS), with the highly hydrophobic residue ‘M’ occurring at position-4 and H occurring at position-2 [1]. The resulting P1 protein was 299 aa long and shared 46.67% nt sequence identity with Verbena virus Y (VVY) and 45.50% with wild potato mosaic virus (WPMV), which

were the best-matched potyvirus sequences. The HC-Pro/P3 junction is cleaved by the HC-Pro protease, which has been shown to cleave at its carboxy terminus between two glycine residues, found in the YLVG₇₅₅/G₇₅₆ context. This cleavage site is the most highly conserved of all the cleavage sites [4]. The mature HC-Pro protein was 456 aa long, and the most closely related potyvirus was potato virus Y (PVY), with 64.16% nt identity. The PTK₆₁₀ motif of HC-Pro, which is known to be required for aphid transmission [8, 11], was present in the protein. All of the remaining seven predicted cleavage sites for the NIa protease were slightly different in the surrounding amino acid sequences. BsMoV had a specific potyviral GDD motif in the NIb region [9, 12] associated with viral RNA replication, a DAG motif in the CP region associated with aphid transmission [3], and a FRNK motif in the HC-Pro region associated with symptom expression [7]. The P1 was the most divergent gene, with only 46.7% nt identity with the most closely related potyvirus, VVY. The putative ORF (named pretty interesting potyviridae ORF—PIPO [6]) was found at nucleotides 2980 to 3222, but instead of containing a G₁₋₂A₆₋₇ sequence [6], it contained a G₂AGA₅ sequence. When the CP sequence was compared, pepper mottle virus (PepMoV) was previously identified as a closely related virus, with 74.36% nt sequence identity. Based upon the complete genome sequence, PepMoV was confirmed to be the most closely related of all potyviruses sequenced to date, with 63.72% nt identity, followed by WPMV, with 62.17% nt identity. PepMoV also displayed the highest nucleotide identity with BsMoV for the CI (69.78%) and NIb (71.54%) coding regions, which are the key regions for potyvirus taxonomy [1]. According to the species demarcation criteria, BsMoV shares far below the 78.2, 77 and 76% nucleotide sequence identity thresholds for the CI, CP and complete genome [2] and, thus, represents a true new species within the genus *Potyvirus*. The phylogenetic relationship between BsMoV and the other potyviruses was illustrated in a phylogenetic tree based on multiple alignments of the entire genome sequence (Fig. 2). In the phylogenetic analysis, the long distance between BsMoV and PepMoV confirmed that BsMoV is

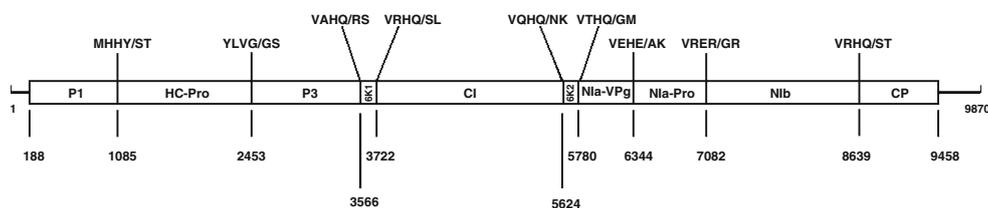


Fig. 1 Schematic representation of the genome organization of BsMoV, depicting coding proteins in cistrons. The numbers below the genome indicate the start position (nt) of each region. The putative proteinase cleavage sites in the polyprotein are indicated above the genome

6. Chung BY, Miller WA, Atkins JF, Firth AE (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5897–5902
7. Gal-On A (2000) A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. *Phytopathology* 90:467–473
8. Huet H, Gal-On A, Meir E, Lecoq H, Raccach B (1994) Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J Gen Virol* 75:1407–1414
9. Inokuchi Y, Hirashima A (1987) Interference with viral infection by defective RNA replicase. *J Virol* 61:3946–3949
10. Lucinda N, Nagata T, Inoue-Nagata AK, Salaroli RB, Kitajima EW (2008) *Brugmansia suaveolens* mottle virus, a novel potyvirus causing leaf mottling of *Brugmansia suaveolens* in Brazil. *Arch Virol* 153:1971–1976
11. Maia IG, Haenni A, Bernardi F (1996) Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J Gen Virol* 77:1335–1341
12. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 8:3867–3874
13. Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2003) Managing sequencing projects in GAP4 environment. In: Krawetz SA, Womble DD (eds) *Introduction to Bioinformatics: A Theoretical and practical approach*. Human Press Inc, Totawa
14. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
15. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal-W—improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680