

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GUILHERME FAGANELLO DRESSANO

Análise da capacidade de silenciamento gênico de *Moniliophthora*
perniciosa como método de controle

Piracicaba

2019

GUILHERME FAGANELLO DRESSANO

Análise da capacidade de silenciamento gênico de *Moniliophthora
perniciosa* como método de controle

Versão revisada de acordo com a Resolução COPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba

2019

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Faganello Dressano, G.

Análise da capacidade de silenciamento gênico de *Moniliophthora perniciosa* como método de controle / Guilherme Faganello Dressano; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Versão revisada de acordo com a Resolução COPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

162 p. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Cacau 2. Expressão gênica 3. Fungicidas 4. Fungos fitopatogênicos 5. Plantas transgênicas 6. RNA de interferência 7. Tomate 8. Vassoura-de-bruxa 9. Xenobiótico
I. Título

CDU 631.52 : 632.27

Elaborada por:

Marilia Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Figueira por ter me aceitado como seu orientado mesmo sabendo das minhas particularidades, por toda a paciência, ensinamentos e atuar verdadeiramente como um orientador durante a minha trajetória aqui;

A minha esposa Bruna por me incentivar desde o início de todas as formas possíveis e suportar às incontáveis dias e noites em que estive ausente, por estar comigo por todo esse tempo, além do grande suporte na formatação e configuração da dissertação;

A minha família, em especial meus pais Ivo e Vera e meus irmãos Gustavo e Ana Julia por terem me incentivado desde sempre a não parar de estudar e continuar em busca de um caminho melhor;

A toda a equipe do LAMP, alunos de pós-graduação, técnicos de laboratório, estagiários e agregados, pelo coleguismo e suporte na condução dos experimentos, em especial a: Rodolfo Maniero pela inestimável paciência, didática e senso de ajuda em todas as etapas dos experimentos, especialmente nas clonagens e até hoje com as dúvidas que tenho; Danielle Scotton e Luciana Chiba pela condução dos experimentos de transformação de MT, sem o qual o mesmo não haveria ocorrido; Albania Torres pela cumplicidade, companheirismo e apoio nas horas em que me sentia fora da minha zona de conforto; Felipe Campana em todos os momentos em que precisei de ajuda no laboratório, em muitos fazendo com as próprias mãos para me ajudar; Daniele Paschoal e Éder Silva pela ajuda, ensinamentos e parceria na condução do experimento com o inibidor de AOX.

Aos colegas do Laboratório de Genômica e Expressão da UNICAMP pela troca de experiências e inúmeras ajudas, em especial a Adrielle Ayumi, Mario Barsottini, Marcelo Carazzolle e Professor Gonçalo Pereira.

A Syngenta Proteção de Cultivos, nas pessoas de Lucas Mialick, Eduardo Ozorio, Lucio Lemes, Dhiego Duvaesch, Caio Prates, Mailson Machado, Patrick Correr e Diogener Araújo por ter permitido que eu realizasse este mestrado conciliando com horas de trabalho e por valorizar e incentivar a ciência e funcionários que buscam conhecimento.

“When things go wrong, as they sometimes will,
When the road you’re trudging seems all uphill,
When the funds are low and the debts are high,
And you want to smile, but you have to sigh,
When care is pressing you down a bit,
Rest, if you must, but don’t you quit.”

John Greenleaf Whittier

RESUMO

FAGANELLO DRESSANO, G. **Análise da capacidade de silenciamento gênico de *Moniliophthora perniciosa* como método de controle**. 2019. 162 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* é o agente causal da doença conhecida como “vassoura-de-bruxa”, que afeta o cacauzeiro (*Theobroma cacao*) e é um dos principais detratadores da produtividade desta cultura no Brasil e no mundo. Os danos ao desenvolvimento do cacauzeiro resultantes da infecção por este fitopatógeno incluem a podridão dos frutos e a indução de brotações laterais nos ramos infectados, resultando no enfraquecimento geral das plantas. Os métodos de controle dessa doença, como resistência genética, podas fitossanitárias e controle químico não se mostraram satisfatórios até o momento. Dadas as particularidades deste patossistema, uma das alternativas que se vislumbra é o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos em rotas metabólicas essenciais ao fungo e, portanto, capazes de reduzir os danos causados pela doença. Na fase biotrófica de *M. perniciosa*, descobriu-se que a via alternativa de transferência de elétrons desempenhada pela enzima oxidase alternativa mitocondrial (AOX) é importante para a produção de ATP e resistência a fungicidas, e trabalhos recentes demonstraram que o uso *in vitro* e *in vivo* de compostos inibidores desta enzima reduziram a viabilidade de esporos de *M. perniciosa*. Neste trabalho, foi proposta nova abordagem *in vivo* de condução de ensaios para avaliação de inibidor da enzima AOX sobre a patogenicidade de *M. perniciosa* no tomateiro ‘Micro-Tom’ (MT) fornecido via radicular por meio de solução nutritiva. Por outro lado, o entendimento dos mecanismos de infecção de fungos fitopatogênicos abre caminho para novas estratégias de controle. Relatos recentes em outros patossistemas sugerem que, além de proteínas efetoras, patógenos empregam pequenos RNAs (sRNA) para manipulação direta do sistema de defesa vegetal. Já foi demonstrado que hospedeiros expressando RNA dupla fita correspondendo a genes alvos do patógeno, incluindo fungos filamentosos, podem gerar pequenos RNAs interferentes (siRNA) que levam ao silenciamento desses genes alvo, denominada HIGS (*Host Induced Gene Silencing*). Neste projeto buscou-se confirmar a presença da maquinaria genética para produção e processamento de pequenos RNAs (sRNA) e o mecanismo de RNA de interferência no genoma de *M.*

perniciosa. Além disso, a planta modelo tomateiro 'Micro-Tom' (MT) foi transformada geneticamente para expressar uma das componentes chaves deste mecanismo (enzimas *Dicers*) visando entender seu papel na patogenicidade de *M. perniciosa* em futuros estudos. Como resultados, tem-se que o inibidor da enzima oxidase alternativa (AOX) '7j-41' administrado preventivamente a inoculação por basidiosporos de *M. perniciosa* foi efetivo em reduzir a severidade da infecção e proteger a produção de biomassa das plantas do efeito deletério do patógeno. Descobriu-se que *M. perniciosa* tem em seu genoma genes participantes da rota de silenciamento gênico canônico descrita em fungos, incluindo três *Dicers* (DCL), 10 Argonautas (AGO) e sete RNA-polimerase dependente de RNA (RdRPs). Alguns genes de cada grupo se mostraram principalmente expressos nas fases de micélio monocariótico, dicariótico, primórdio e basidiomata, sugerindo importância em etapas da interação planta-patógeno. Obteve-se com sucesso plantas de tomateiro 'Micro-Tom' transgênicas com a construção concatenada contendo fragmentos das três *Dicers* do fungo, a partir de onde se poderá em futuros trabalhos avaliar se *M. perniciosa* emprega sRNAs como efetores de virulência em tomateiro MT.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*. Silenciamento gênico. Inibidor da oxidase alternativa mitocondrial.

ABSTRACT

FAGANELLO DRESSANO, G. **Gene silencing analysis as a control method against *Moniliophthora perniciosa***. 2019. 162 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

The Basidiomycete fungus *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of the disease known as “witch's broom disease”, which affects cacao tree (*Theobroma cacao*) and is one of the main detractors of the productivity of this crop in Brazil and worldwide. The damage to cacao trees resulting from infection by this plant pathogen includes fruit rot and induction of lateral shoots in the infected branches, resulting in general weakening of the plants. Control methods of this disease, such as genetic resistance, phytosanitary pruning and chemical control have been shown to be palliative measures. Given the peculiarities of this pathosystem, one of the envisioned alternatives is the development of biologically active compounds on essential metabolic pathways capable of reducing the damage caused by the disease. In the biotrophic phase of *M. perniciosa*, it has been found that the alternative electron transfer pathway played by the enzyme alternative mitochondrial oxidase (AOX) is important for ATP production and fungicide tolerance. Recently, it was shown that *in vitro* and *in vivo* inhibition of this enzyme reduced the viability of *M. perniciosa* spores. In this work, a new *in vivo* approach is purposed for the evaluation of AOX synthetic inhibitor to assess its efficacy against *M. perniciosa* in the tomato model 'Micro-Tom' (MT), sourced by roots via nutrient solution. On the other hand, understanding the mechanisms of phytopathogenic fungi infection paves the way for new control strategies. Recent reports in other pathosystems suggest that, in addition to effector proteins, pathogens employ small RNAs (sRNA) for direct manipulation of the plant defense system. Hosts expressing double-stranded RNA corresponding to target genes of the pathogen, including filamentous fungi, have been shown to generate small interfering RNAs (siRNA) that lead to the silencing of these target genes, in an approach named Host Induced Gene Silencing (HIGS). This project aimed to confirm the presence of genetic machinery for the production and processing of small RNAs (sRNA) and the RNA interference mechanism in the *M. perniciosa* genome. In addition, the 'Micro-Tom' (MT) model tomato was genetically transformed to express one of the key components of this mechanism (*Dicers enzymes*) to understand its role in the

pathogenicity of *M. perniciosa* in future studies. As a result, alternative oxidase inhibitor (AOX) '7j-41' preventively administered to inoculation of *M. perniciosa* basidiospores was effective in reducing the severity of infection and protecting plant biomass from the deleterious effects of the pathogen. *M. perniciosa* has in its genome genes participating in the canonical gene silencing pathway described in fungi, including three *Dicers* (DCL), 10 Argonauts (AGO), and seven RNA-dependent RNA polymerase (RdRPs). These genes were mainly expressed in the monocarotic, dicarotic, primordial and basidioma mycelium phases, suggesting importance in several stages of plant-pathogen interaction. Transgenic 'Micro-Tom' tomato plants have been successfully obtained with the concatenated construction with fragments of the three fungus *Dicers*, from which it will be possible to further evaluate whether *M. perniciosa* employs sRNAs as virulence effectors in MT tomato.

Keywords: *Moniliophthora perniciosa*. Gene silencing. Alternative oxidase inhibitor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de predição da mobilidade de xenobióticos.....	28
Figura 2. Modelo mais atual de predição da mobilidade de xenobióticos	29
Figura 3. Rota de silenciamento gênico canônica proposta para o fungo <i>N. crassa</i> .32	
Figura 4. Silenciamento gênico canônica proposta para o fungo <i>N. crassa</i>	33
Figura 5. Plantas de MT mantidas em câmara úmida por 24 horas antes da inoculação com basidiósporos de <i>M. perniciosa</i>	40
Figura 6. Cronograma simplificado com as etapas de condução do experimento com o inibidor da AOX '7j-41'.....	41
Figura 7. Representação esquemática da união dos fragmentos das três <i>Dicers</i> de <i>M. perniciosa</i> por técnica de PCR.....	51
Figura 8. Sintoma típico da infecção de tomateiros 'Micro-Tom' por <i>M. perniciosa</i> avaliados 25 dias após a inoculação. A. Inoculado; B. Não-inoculado.....	56
Figura 9. Avaliação do diâmetro (mm) de plantas de MT ao longo do tempo após a inoculação ¹	57
Figura 10. Avaliação da altura (cm) de MT ao longo do tempo após a inoculação ¹ ..	58
Figura 11. Avaliação de biomassa seca (g) por parte da planta de MT aos 55 DAI ¹	59
Figura 12. Avaliação de contagem de frutos por planta de MT aos 55 DAI ¹	59
Figura 13. Visão geral das plantas de MT (esquerda para direita) aos 35 DAI: A. Controle não-inoculada, B. Controle + '7j-41', C. Inoculada + '7j-41' e D. Inoculada	60
Figura 14. Esquema simplificado das etapas e componentes do silenciamento gênico canônico com os genes encontrados no genoma de <i>M. perniciosa</i>	68
Figura 15. Representação esquemática de fragmentos que compõem a sequência MpDCL-1/2/3 que originarão cada uma das <i>Dicers</i> de <i>M. perniciosa</i> (MpDCL-1, MpDCL-2, MpDCL-3) e a localização de cada siRNA predito	78
Figura 16. Representação do vetor de silenciamento pK7GWIWG2(II), contendo o promotor CaMV35S, os <i>primers</i> concatenados dos genes MP14055 (<i>Dicer-like</i> 1), MP10442 (<i>Dicer-like</i> 2) e MP01869 (<i>Dicer-like</i> 3), genes de resistência a antibióticos, íntron e terminador 35S.....	79
Figura 17. Regeneração de plantas MT-DCL1/2/3 contendo a construção DCL1/2/3 do primeiro (A) e segundo (B) eventos em meio de enraizamento; plantas do primeiro evento em aclimatação (C); plantas sobreviventes usadas para as confirmações de transformação (D)	80

Figura 18. Gel de 2% agarose contendo a amplificação específica da construção DCL-1/2/3 no vetor de silenciamento pK7GWIWG2(II). Marcador de peso molecular de 1 KB (Fermentas)..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência completa dos genes e <i>primers</i> (<i>forward</i> em verde e <i>reverse</i> em vermelho) e tamanho do <i>amplicon</i> (sublinhado) das três <i>Dicers</i> (MP14055, MP10442 e MP01869) de <i>M. pernicioso</i> usados na clonagem.....	44
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na união dos fragmentos de <i>Dicers</i> de <i>M. pernicioso</i> . Em negrito, estão representadas as bordas coesivas adicionadas aos fragmentos de DNA.....	51
Tabela 3. Genes candidatos a participarem da rota de processamento canônico de pequenos RNAs de <i>M. pernicioso</i> após busca por palavra-chave e BLASTp, indicando a classe, número e identificação dos genes presumíveis em <i>Moniliophthora pernicioso</i>	64
Tabela 4. Proposta de genes participantes da rota de processamento de pequenos RNA canônico de <i>Moniliophthora pernicioso</i> indicando a classe, número de genes identificados e a identificação dos genes presumíveis.....	65
Tabela 5. Expressão dos genes <i>Dicers</i> encontrados no genoma de <i>M. pernicioso</i> em RPKM (<i>Reads Per Kilobase Million</i>) em função da condição biológica em que infestam cacaueteiro.....	69
Tabela 6. Expressão dos genes Argonautas encontrados no genoma de <i>M. pernicioso</i> em RPKM (<i>Reads Per Kilobase Million</i>) em função da condição biológica em que infestam cacaueteiro.....	70
Tabela 7. Expressão dos genes RdRPs encontrados no genoma de <i>M. pernicioso</i> em RPKM (<i>Reads Per Kilobase Million</i>) em função da condição biológica em que infestam cacaueteiro.....	71
Tabela 8. Sequências de <i>Dicers</i> encontradas no genoma de <i>Moniliophthora pernicioso</i>	76
Tabela 9. Predição de siRNAs formados a partir da expressão da construção pK7GWIWG(II)::MpDCL-1/2/3.....	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1. O patossistema <i>M. perniciosa</i> x <i>T. cacao</i>	20
2.2. Controle químico de fitopatógenos e uso de inibidores da enzima oxidase alternativa (AOX).....	23
2.3. Silenciamento gênico em fungos	30
2.4. Componentes e função dos genes essenciais do silenciamento gênico em fungos	34
2.5. Indução de silenciamento gênico pelo hospedeiro (HIGS).....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Ensaio com inibidores da AOX.....	38
3.1.1. Produção de basidiósporos de <i>M. perniciosa</i> biótipo-S.....	38
3.1.2. Produção e condução das mudas de MT	38
3.1.3. Tratamento com inibidor da AOX '7j-41'	39
3.1.4. Dissolução do inibidor da AOX '7j-41' em água.....	39
3.1.5. Inoculação com basidiósporos de <i>M. perniciosa</i> biótipo-S	40
3.1.6. Avaliação da infecção e dos sintomas de <i>M. perniciosa</i> biótipo-S.....	41
3.2. Desenho da rota de silenciamento gênico canônico em <i>M. perniciosa</i>	42
3.3. Transformação de tomateiro MT para expressar <i>Dicers</i> de <i>M. perniciosa</i> ...	43
3.3.1. Busca de sequências de <i>Dicers</i> para silenciamento gênico de <i>Monilophthora perniciosa</i>	43
3.3.2. Construção de vetor de siRNA	43
3.3.3. Clonagem do fragmento MpDCL-1/2/3	51
3.3.4. Recombinação do fragmento MpDCL-1/2/3 em vetor de silenciamento	52
3.3.5. Transformação genética de tomateiro via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	52
3.3.5.1. Material vegetal.....	52
3.3.5.2. Plasmídeos e condições de cultura de <i>A. tumefaciens</i>	52
3.3.5.3. Inoculação e co-cultura	53
3.3.5.4. Seleção e obtenção das plantas transformadas	53
3.3.5.5. Confirmação da transformação das plantas de MT.....	53

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1. Ensaio com inibidores da AOX	55
4.2. Identificação de genes da rota de silenciamento gênico em <i>Moniliophthora perniciosa</i>	63
4.2.1. Busca dos genes.....	63
4.2.2. Análise de expressão dos genes da rota de processamento canônico de pequenos RNAs proposta para <i>M. perniciosa</i>	69
4.3. Transformação de MT para expressar <i>Dicers</i> de <i>M. perniciosa</i>	75
5. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	97

1. INTRODUÇÃO

A doença “vassoura-de-bruxa” é uma importante enfermidade do cacauero (*Theobroma cacao*), cujo agente causal é o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Purdy; Schimdt, 1996). Essa doença corresponde a um dos principais fatores limitantes à produção de cacau na América do Sul (Bowers et al., 2001), representando também uma ameaça à produção mundial (Purdy; Schimdt, 1996; Teixeira et al., 2015; Marelli et al., 2019). No final da década de 1980, a invasão do fungo *M. perniciosa* da região sul da Bahia, estado que deteve 60% das terras em cultivo de cacaueros no Brasil, causou grande devastação nas lavouras. Isso levou à queda de 50 a 90% na produção, de modo que o Brasil passasse de país tipicamente exportador para importador de cacau (Andebrhan et al., 1999). Os sintomas característicos da “vassoura-de-bruxa” incluem o inchamento do caule e indução de brotações laterais nos ramos infectados, perda de dominância apical, formação de frutos partenocárpicos e podridão dos frutos (Purdy; Schimdt, 1996; Teixeira et al., 2015). O fungo *M. perniciosa* possui um ciclo de vida hemibiotrófico, no qual apresenta dois tipos de micélio: monocariótico e dicariótico. A infecção por esse fungo é caracterizada por uma fase biotrófica peculiarmente extensa e sintomática (Teixeira et al., 2015). O controle da enfermidade em campo está limitado ao uso da resistência genética. Outra alternativa de controle se refere a podas fitossanitárias, com a remoção das partes infectadas (frutos e ramos), que consiste numa medida paliativa devido à dificuldade de retirar todos os tecidos infectados e pelos altos custos (Purdy; Schimdt, 1996). Os métodos de controle por aplicação de fungicidas não oferecem resultados economicamente favoráveis, e há poucas opções de controle biológico. A aplicação de fungicidas apresenta eficácia limitada devido à característica da infecção, que ocorre apenas em tecidos meristemáticos em crescimento, que limitam a cobertura de ação dos fungicidas, aliado a ocorrência de chuvas constantes em regiões produtoras (Purdy; Schimdt, 1996). Alternativas de controle inovadoras são necessárias urgentemente para permitirem a sustentabilidade da produção de cacau e conseqüentemente de chocolate.

Dentre estas alternativas está a descoberta de novos compostos antifúngicos que, aliados ou não a outros fungicidas, possam fornecer controle mais eficiente do fungo causador da vassoura-de-bruxa. Uma das etapas iniciais para este desenvolvimento é encontrar rotas metabólicas essenciais para a sobrevivência do

fungo e sintetizar drogas capazes de bloquear a ação de uma ou mais enzimas vitais para se completar esta etapa. A respiração celular é um dos processos vitais alvejados por muitos fungicidas atualmente em uso na agricultura, e entre os compostos mais usados por sua eficácia estão as estrobirulinas, que atuam especificamente na cadeia respiratória do complexo III das mitocôndrias (Bartlett et al., 2002).

Na via respiratória de *M. pernicioso* descobriu-se que a via paralela de captação de elétrons dependente da enzima oxidase alternativa (AOX) é de grande importância para completar seu ciclo de vida, adaptação e resposta a estresses na cadeia principal de captação de elétrons e mecanismo de resistência a compostos antifúngicos que aí atuam (Thomazella et al., 2012). Assim, a interrupção da via alternativa de transporte de elétrons por meio da aplicação de compostos inibidores da AOX, associada ou não com a interrupção da via principal de transporte de elétrons por citocromos por antifúngicos do grupo das estrobirulinas poderia, em tese, reduzir a patogenicidade e os danos causados por *M. pernicioso* ao cacauero.

O tomateiro “Micro-Tom” (MT) foi escolhido para estudo da interação *M. pernicioso* X *T. cacao*, por já ter sido validado em outros estudos e principalmente por ser suscetível ao biótipo S de *M. pernicioso* que infecta solanáceas o que traz considerável simplificação da metodologia de estudo deste patossistema (Scotton et al., 2017; Deganello et al., 2014).

Do ponto de vista da interação planta-patógeno, há relatos recentes em outros patossistemas sugerindo que, além de proteínas efetoras, patógenos podem empregar pequenos RNAs (sRNA) para manipulação direta do sistema de defesa vegetal (Wang et al., 2016). Já foi demonstrado que hospedeiros expressando RNA dupla fita (dsRNA) correspondendo a genes alvos do patógeno, incluindo fungos filamentosos, podem gerar pequenos RNAs interferentes (siRNA) que levam ao silenciamento desses genes alvo, numa abordagem denominada HIGS - *Host Induced Gene Silencing* (Nunes; Dean, 2012).

A abordagem de uso de sequência de genes do patógeno para obter resistência é denominada de ‘Resistência Derivada do Patógeno’ ou PDR – *pathogen derived resistance* (Sanford; Johnston, 1985). Esta técnica apresenta grande potencial de aplicação no controle de patógenos em plantas (Tinoco et al., 2010). O fungo *M. pernicioso* já demonstrou ser sensível ao silenciamento gênico pelo fornecimento de dsRNA (Caribé dos Santos et al., 2009).

Já que AOX é uma enzima chave para a sobrevivência do fungo *M. perniciosus* como fator de adaptação a condições em que a cadeia principal de elétrons está inibida, o isolamento e síntese de compostos inibidores da AOX pode ser suficiente ou complementar a ação das estrobirulinas e uma futura alternativa a ser explorada no controle de *M. perniciosus*.

Além disso, baseado no constatado em outros patossistemas, há de se elucidar se o fitopatógeno *M. perniciosus* possui mecanismos de produção e processamento de pequenos RNAs (sRNA), que podem estar associados na interação com seus hospedeiros, afetando o nível de expressão de genes de virulência e/ou de defesa da planta, e se o silenciamento de um de seus componentes importantes (enzimas *Dicers*) poderia reduzir sua patogenicidade.

Neste trabalho foram exploradas estas duas estratégias para controle da infecção de *M. perniciosus*: primeiramente avaliando-se a aplicação *in planta* de um novo composto que afeta a Oxidase Alternativa; e também a elucidação dos genes codificadores da rota de produção de pequenos RNAs (sRNAs), bem como na clonagem de um componente desta rota para expressão em duplo sentido (dsRNA) em tomateiro MT visando silenciar esta rota.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O patossistema *M. pernicioso* x *T. cacao*

Cultivos agrícolas estão continuamente expostos a pragas, plantas daninhas e doenças, estas causadas por bactérias, fungos, vírus e outros microrganismos, resultando em uma perda de produtividade de 20 a 40% globalmente, mesmo com as diversas técnicas de manejo adotadas pelos agricultores na tentativa de contorná-las (FAO, 2017).

Um dos casos mais marcantes deste impacto numa cultura de alta importância é a enfermidade conhecida como “vassoura-de-bruxa” do cacau. Causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora pernicioso* (Aime; Phillips-Mora, 2005) [syn. *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer; *Marasmiaceae sensu lato*] (Purdy; Schimdt, 1996). Nativo da região amazônica, a invasão deste fungo em regiões produtoras de cacau provocou o colapso das lavouras na América do Sul e Caribe, tendo ocorrido mais recentemente no sul da Bahia (Andebrhan et al., 1999), o que transformou o Brasil de país tipicamente exportador em importador de cacau, gerando sérios prejuízos econômicos e sociais para o país.

Moniliophthora pernicioso é considerado um patógeno hemibiotrófico, exibindo uma fase biotrófica peculiarmente longa, podendo ultrapassar os 90 dias e notavelmente sintomática, apresentando micélio com morfologia e comportamento distintos nas fases biotrófica e necrotrófica (Griffith; Hedger, 1994; Teixeira et al., 2014). Basidiósporos dão origem a tubos germinativos, que ao penetrarem o tecido do hospedeiro, geram hifas primárias, convolutas, largas (5 a 20 µm), mononucleadas e sem grampos de conexão (fase biotrófica). Por outro lado, hifas delgadas (1 a 3 µm) e regulares, apresentando grampos de conexão e, portanto, binucleares, são típicas da fase necrotrófica. Em geral, a fase biotrófica tem sido associada ao micélio monocarioto, mas há descrições contraditórias sobre a condição nuclear durante essa fase (Delgado; Cook, 1976). Ambos os tipos de micélio podem ocorrer ao mesmo tempo durante a colonização de tecidos vivos (Ceita et al., 2007). Durante a fase inicial de infecção, as hifas crescem em baixa densidade e intercelularmente no hospedeiro (apoplasto), enquanto que, após a necrose, as hifas crescem intensamente por todo o tecido (Evans, 2016). Até o momento, não se conhece exatamente o que determina

a mudança de fase em *M. pernicioso* da biotrófica para a necrotrófica, nem se a morte da vassoura-verde é a causa ou o efeito dessa transição.

A infecção do cacauero ocorre apenas por meio da penetração dos tubos germinativos originados dos basidiósporos em tecidos meristemáticos, ou seja, lançamentos foliares, flores ou frutos em desenvolvimento (Purdy; Schmidt, 1996).

Ao penetrar o cacauero, o micélio biotrófico se alastra pelo apoplasto e os ramos infectados apresentam sintomas de inchamento e excesso de brotações, com perda de dominância apical, resultando assim na formação de sintomas morfológicamente semelhantes a vassouras, denominados de “vassoura-verde” decorrentes da superbrotção. A infecção de almofadas florais e frutos acarretam no desenvolvimento de flores anormais e frutos partenocárpico, além do surgimento de deformações e manchas necróticas em frutos em desenvolvimento (Purdy; Schmidt, 1996). De 4 a 8 semanas após a infecção do cacauero, ocorre a necrose das vassouras, que passam a ser denominadas de “vassoura-secas”. O ciclo da doença se completa quando as vassouras ou frutos necrosados e secos são expostos a períodos de alternância entre períodos de chuva e estiagem, o que favorece o surgimento de basidiocarpos, que liberam basidiósporos a serem distribuídos pelo vento (Purdy; Schmidt, 1996).

Além do cacauero, *M. pernicioso* apresenta uma variedade de hospedeiros, permitindo que seus isolados sejam classificados em três biótipos, -C, -L e -S (Griffith; Hedger, 1994). O biótipo-C é responsável pela infecção do cacauero e de outras espécies de *Theobroma* e *Herrania*, enquanto o biótipo-S coloniza membros de *Solanaceae*, com evidências de indução dos sintomas característicos da doença (Marelli et al., 2009; Deganello et al., 2014). Por fim, o biótipo-L infecta lianas e cipós, sobretudo da família *Bignoniaceae*, sem induzir sintomas (Griffith; Hedger, 1994).

Para estudo do patossistema *M. pernicioso* X *T. cacao*, tem-se adotado o tomateiro “Micro-Tom” como modelo, principalmente pela disponibilidade de isolados de *M. pernicioso* que infectam solanáceas (biótipo-S) e apresentam sintomas semelhantes aos que se observa em *T. cacao*. Outras vantagens que o uso deste cultivar apresenta incluem o porte reduzido, ciclo relativamente curto e protocolos bem estabelecidos transformação genética, permitindo que descobertas sejam feitas e extrapoladas em um menor tempo, sem todas as dificuldades biológicas de estudá-las em plantas de *T. cacao* (Deganello et al., 2014; Scotton et al., 2017).

As perdas econômicas da produção do cacauzeiro decorrem principalmente da infecção dos frutos, juntamente com a debilitação geral das plantas, com os tecidos infectados atuando como drenos fisiológicos para o restante da planta (Teixeira et al., 2014). Outras possíveis consequências estão sendo aos poucos esclarecidas, e, apesar da infecção se manter apenas na região inicialmente atingida (efeito não sistêmico), recentemente Paschoal (2018) demonstrou que poucos dias após a infecção de tomateiro 'Micro-Tom' por *M. perniciosa* já é possível observar redução da massa seca de raízes o que possivelmente é extrapolável para as plantas de cacauzeiro. Isso indica que algum efeito sistêmico poderia estar ocorrendo, afetando inclusive a produção de frutos (Paschoal, 2018). Em cacauzeiro, a infecção de plantas enxertadas indicou que pode ocorrer uma interação positiva entre as raízes (porta-enxerto) e a parte aérea, resultando em uma maior resistência contra *M. perniciosa* (Ribeiro et al., 2016).

Atualmente, o controle da enfermidade em campo está limitado ao uso de podas fitossanitárias, aplicação de fungicidas ou agentes biológicos, todos de eficácia limitada, enquanto que o uso de genótipos resistentes representa o método de menor custo econômico e ambiental (Purdy; Schmidt, 1996). O controle genético por meio de cultivares resistentes é preconizado como método ideal, desde que as plantas atinjam a qualidade e adaptabilidade da região produtora e níveis adequados de resistência (Massola et al., 2011). Isto eliminaria a necessidade de esforços adicionais para se reduzir as perdas, como controle químico, cultural e mecânico.

No caso do cacauzeiro, atualmente há material genético em avaliação para resistência tanto a *M. perniciosa* como a *M. royeri* (causadora da *frosty pod rot*) e QTLs foram identificados para contribuir nessa seleção. (Bailey et al., 2018; Evans, 2016; Royaert et al., 2016). No entanto, opções de curto prazo são requeridas tanto em regiões que já possuem os patógenos, como em regiões onde possam vir a ocorrer para protegê-las de eventuais epidemias agrícolas e isto inclui, entre outras medidas, o uso de fungicidas.

No início da década de 1980, trabalhos extensos foram conduzidos na tentativa de se encontrar o melhor manejo com produtos químicos fungicidas associados a práticas culturais que promovessem controle satisfatório da vassoura-de-bruxa (Laker, 1991). Produtos de ação de contato, como óxido de cobre foram recomendados na região produtora da Bahia em aplicações mensais, de forma preventiva e associados a práticas culturais de poda de ramos infectados (Oliveira; Luz, 2005). Também

fungicidas com ação sistêmica, como estrobirulinas, triazóis e benzimidazóis foram testados e se mostraram efetivos em reduzir a germinação de esporos, esporulação e crescimento micelial do fungo *in vitro* e em casa de vegetação, e em alguns casos também sob condições de campo. No entanto, nunca houve adoção em escala pelos produtores de cacau por inconsistências quanto a viabilidade técnica e econômica (Albuquerque et al., 2005; Mota et al., 2010).

Trabalhos mais recentes sugerem que aplicações foliares do fungo *Trichoderma* spp. associadas com aplicações de fungicidas protetores de contato, como óxido de cobre e clorotalonil, podem reduzir a fonte de inóculo do fungo (esporos) e ser uma alternativa de manejo (Medeiros et al., 2010). Outro grupo de compostos testados são os indutores de resistência, pequenas moléculas classificados como elicitores sintéticos capazes de induzir resposta imune vegetal mimetizando o sistema de defesa natural das plantas (Bektas; Eulgem, 2015). Costa et al. (2010) avaliando estes elicitores verificaram níveis de controle inconsistente e baixa viabilidade econômica, motivo pelo qual concluiu não serem boas alternativas por ora para serem adotados em campo para manejo de *M. perniciosa*.

Desta forma, fica evidente a carência e necessidade de desenvolvimento de novos e efetivos métodos para o controle de *M. perniciosa*, contemplando todas as particularidades do sistema de produção de cacau e do patossistema *M. perniciosa* x *T. cacao*, tanto do ponto de vista de controle genético, cultural, mecânico e químico.

2.2. Controle químico de fitopatógenos e uso de inibidores da enzima oxidase alternativa (AOX)

Fungicidas tem sido usados por muitos anos e novos continuam a ser desenvolvidos para suportar a ambição de produzir mais alimentos e proteger os cultivos do efeito destruidor de fitopatógenos. Maloy (2005) fez completa revisão histórica sobre descoberta, desenvolvimento e adoção de fungicidas na agricultura. Os primeiros fungicidas eram elementos simples, como enxofre ou compostos metálicos de cobre ou mercúrio, e portanto, inorgânicos, como a calda bordalesa a base de sulfato de cobre. No início do século XX, foram descobertos os primeiros fungicidas orgânicos como thiram, captan e ditiocarbamatos. Foram descritos como, de amplo espectro, com ação de contato (não sistêmicos) ou com ação protetora preventiva sobre uma ampla gama de doenças fúngicas de plantas. No início da

década de 1960, fungicidas sistêmicos foram desenvolvidos. A maioria deles não era verdadeiramente sistêmico, mas com alguma mobilidade, normalmente translaminar e com algum efeito pós-infecção, e alguns destes compostos apresentavam movimento apoplástico. Alguns destes fungicidas parcialmente sistêmicos são do grupo dos inibidores da síntese de esterol (SBI - *sterol biosynthesis inhibitors*) e inibidores da demetilação (DMI - *demethylation inhibitors*), capazes de se movimentar em alguns tecidos das plantas e eliminar infecções iniciais. Outros podem ter estreita faixa de atividade para controle de grupos específicos de doenças, como míldios, ferrugens e oídios, enquanto outros tem espectro mais amplo.

Apesar de vantajoso do ponto de vista de especificidade e menor risco de impactos adversos em outros organismos, fungicidas com a característica de espectro estreito, com modo de ação único e atividade sítio-específica controlada por um ou poucos genes, tem o revés de serem particularmente propensos a selecionar mais facilmente populações de patógenos resistentes (Hahn, 2014; Lucas et al., 2015).

Dentre os fungicidas sítio-específicos mais recentemente descobertos e de mais ampla utilização na agricultura estão as estrobirulinas sintéticas da classe QoI (*Quinone Outside Inhibitors*) (Bartlett et al., 2002). Estes compostos foram inicialmente isolados como antibióticos a partir do micélio do basidiomiceto *Strobilurus tenacellus*, estirpe 21602, e se mostraram altamente ativos contra leveduras e fungos filamentosos (Anke et al., 1977). As estrobirulinas atuam inibindo a cadeia respiratória mitocondrial por meio da ligação específica ao centro do citocromo bc1 (complexo III), reduzindo a produção de energia e levando ao estresse oxidativo e colapso das funções vitais do fungo (Bartlett et al., 2002). São consideradas excepcionais do ponto de vista de espectro de ação, ao mesmo tempo em que apresentam baixa toxicidade a plantas e animais.

Mesmo tendo sido adotados com sucesso em diversos patossistemas e áreas extensas, o uso de estrobirulinas não tem se mostrado suficiente no controle de *M. pernicioso* em cacauzeiro (Albuquerque et al., 2005). A análise do transcriptoma de *M. pernicioso* após tratamento com a estrobirulina azoxistrobina revelou alteração do metabolismo energético para compensar a redução na produção de ATP e permitir sua sobrevivência (Prado, 2016). Foi observada a ativação de genes que reprimem os efeitos tóxicos da inibição da cadeia respiratória mitocondrial, como proteínas relacionadas a proteção contra estresse oxidativo (peroxidases e glutatona S-transferases), resistência a estresses (*heat shock proteins*) e de transportadores

relacionados a resistência a drogas, como ABC (*ATP-binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*) e CYP450 (citocromo P450 monooxigenases), sabidamente com grande potencial para detoxificação (Prado, 2016; Mondego et al., 2008).

Também em *M. pernicioso*, descobriu-se que a via respiratória dependente da enzima oxidase alternativa (AOX) tem importante papel no ciclo de vida e adaptação do fungo durante a infecção, podendo esta enzima ser um alvo importante de compostos inibidores para controle da 'vassoura-de-bruxa' e ainda pouco explorado pela indústria no desenvolvimento de fungicidas (Thomazella et al., 2012).

A enzima AOX ocorre em todas as plantas e seres de outros domínios da vida, como fungos e animais. Apesar de algumas divergências, o papel mais aceito para esta enzima é na resposta a estresses associados com a cadeia principal de captação de elétrons para geração de energia através de citocromos (CRC), como por exemplo inibidores do complexo III (Vanlerberghe et al., 2009). Nestas ocasiões, a enzima AOX age de forma sobreposta as cadeias principais de elétrons de forma a evitar efeitos deletérios ao organismo, evitando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Vanlerberghe et al., 2009).

A AOX tem se mostrado uma via de auxílio a sobrevivência em condições de estresse oxidativo induzidos por fungicidas para a maioria dos fitopatógenos, como *Magnaporthe oryzae*, *Mycosphaerella graminicola* e *Botrytis cinerea*, sendo, portanto, um mecanismo potencial de resistência a este grupo de antifúngicos (Prado, 2016). Há alguns casos, como por exemplo *M. oryzae*, em que a deleção do gene *aox* não surtiu nenhum efeito na sua patogenicidade nem na alteração no seu ciclo biológico (Avila-Adame; Koller, 2002). Cabe salientar, porém, as diferenças marcantes existentes entre *M. oryzae* e *M. pernicioso*. *M. oryzae* possui uma fase biotrófica com poucos dias de duração, enquanto em *M. pernicioso* esta fase pode durar até 90 dias em que o fungo fica em contato com a planta durante a infecção e sofrendo as respostas de defesa da planta (produção de ROS, por exemplo), momento no qual a via AOX pode de fato lhe servir para garantir sucesso na infecção (Thomazella et al., 2012).

Diversos estudos com *M. pernicioso* evidenciaram um papel para a AOX no ciclo de vida do fungo, notadamente ao diminuir a presença de ROS em situações de estresse na via principal de captação de elétrons pela cadeia respiratória (Almeida, 2014; Thomazella et al., 2012). O tratamento do fungo com o fungicida azoxistrobina aumentou a transcrição da AOX e prolongou a duração da fase biotrófica, confirmando

um dos papéis desta enzima em condições de inibição da cadeia principal de transporte de elétrons e atuando como via alternativa da produção de energia (Thomazella et al., 2012). Durante a fase biotrófica deste fungo, observou-se o aumento pronunciado na transcrição de genes e efetiva tradução da enzima AOX. Quando aplicados na fase biotrófica, os inibidores de AOX n-propil galato e ácido salicil hidroxâmico (SHAM) inibiram o crescimento micelial *in vitro* do fungo (Thomazella et al., 2012).

Mesmo permitindo que o fungo sobreviva em condições de estresse, a via respiratória através da AOX traz consequências importantes para o seu crescimento, entre as quais a redução na geração de ATP em aproximadamente um terço em relação a via principal, o que se traduz em menor crescimento e acúmulo de biomassa. Este fato é corroborado durante a fase biotrófica de desenvolvimento de *M. perniciosus* em que o fungo progride de forma lenta. Apesar do efeito negativo na taxa de crescimento, a AOX atua na desintoxicação de ROS proveniente de compostos de defesa produzidos pela planta (como óxido nítrico) nos estágios iniciais da infecção (Scarpari et al., 2005).

Portanto, já que estrobirulinas são um dos grupos de fungicidas de maior adoção pela alta eficiência controle de muitos fitopatógenos, baixo impacto no meio ambiente e baixa toxicidade a organismos não-alvo e, atuam por inibição da cadeia principal de elétrons da respiração; e que a AOX é uma enzima chave para o fungo *M. perniciosus* como fator de adaptação a condições em que a cadeia principal de elétrons está inibida; conclui-se que o isolamento, síntese e desenvolvimento de compostos inibidores da AOX pode ser suficiente ou complementar a ação das estrobirulinas e uma futura alternativa a ser explorada no controle de *M. perniciosus*.

Recentemente, Barsottini et al. (2019) descreveram a síntese e avaliação de novos compostos inibidores da AOX e sua atividade em *M. perniciosus*. Estes compostos são derivados do ácido gálico e ácido hidroxâmico, conhecidos a algum tempo, inclusive com propriedades de uso farmacológica, como ascofuranonas e análogos (Saimoto et al., 2013). Para se buscar quais compostos teriam maior potencial como inibidores da AOX, Barsottini et al. (2019) usaram a levedura *Pichia pastoris* e avaliaram 74 derivados de N-fenilbenzamidás a partir da medição da respiração e crescimento da levedura, obtendo informações sobre potência, seletividade e atividade antifúngica. O composto '7j-41' foi considerado o mais efetivo dentro dos parâmetros de avaliação e capaz de prevenir a germinação de

basidiósporos de *M. pernicioso* *in vitro*, bem como o desenvolvimento de sintomas de ‘vassoura-de-bruxa’ quando aplicado de forma preventiva em solução com basidiósporos de *M. pernicioso* sobre plantas de tomateiro ‘MT’ (Barsottini et al., 2019).

Este trabalho evidenciou que compostos inibidores da AOX apresentam atividade sobre esporos de *M. pernicioso*, protegendo plantas MT preventivamente à infecção. Há, no entanto, uma dificuldade inerente em relação a esta efetividade pelo fato de o cacauzeiro se tratar de uma cultura perene, exposta a infecção pelo fungo frequentemente em condições de cultivos comerciais em campo e, portanto, em algum grau já infectadas. O tratamento preventivo seria efetivo em proteger novos cultivos e mitigar futuras infecções, mas não plantas já infectadas como é o caso das áreas produtoras.

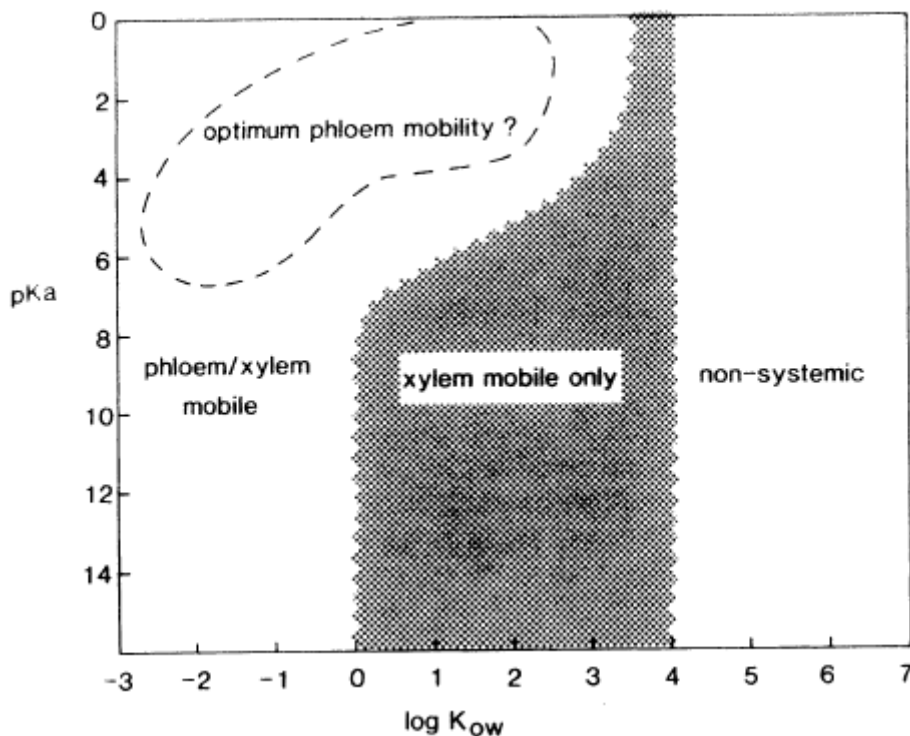
Sabe-se que após penetrar na planta nos tecidos meristemáticos (folhas, flores e frutos em desenvolvimento), basidiósporos de *M. pernicioso* colonizam lentamente os espaços intercelulares (apoplasto) da planta com suas hifas na fase inicial da infecção (Purdy; Schmidt, 1996). Com isso, como próxima etapa do trabalho de Barsottini et al. (2019), o objetivo foi avaliar o uso de inibidores da AOX aplicados por meio do xilema via raízes e avaliar se preveniriam a infecção promovida no meristema apical da planta e surgimento de sintomas do patógeno. Caso positivo, isto seria um indicativo de que o antifúngico inibidor da AOX está sendo de alguma forma translocado das raízes até o meristema apical, protegendo a planta no ponto de infecção ou durante a colonização inicial do apoplasto.

Uma das dificuldades que emergem desta constatação é que, para surtir efeitos satisfatórios, o antifúngico deveria translocar a planta a partir do xilema em toda a sua extensão, antes que ela entrasse em contato com *M. pernicioso* e para tal, há necessidade que o antifúngico tenha propriedades de se translocar pelo xilema da planta.

Para que um composto químico que entra pelas raízes de uma planta atinja o xilema, ele deve ultrapassar a epiderme, cortex, endoderme e periciclo. É o balanço de propriedades de solubilidade e lipofilicidade que determinam seu potencial de movimento das raízes para outras partes da planta por meio do xilema (Chris et al., 2010). Um dos modelos adotados da predição de translocação de xenobióticos orgânicos em plantas é o proposto por Bromilow et al. (1990) (Figura 1) em estudo com herbicidas, e posteriormente ampliado para fungicidas e outros. Este modelo leva

em conta dois parâmetros físico-químicos do xenobiótico: 'pKa', coeficiente de dissociação ácida, indicador do potencial de ionização e 'Kow', coeficiente de partição água: octanol, que representa o balanço entre propriedades solúveis em água e lipídeos de um composto químico. O inibidor da AOX '7j-41', apresenta 'pKa' de 14,8 e log 'Kow' é 4,0 (dados não publicados) o que, pelo modelo de Bromilow et al. (1990) o classificaria no limiar entre imóvel e móvel somente pelo xilema.

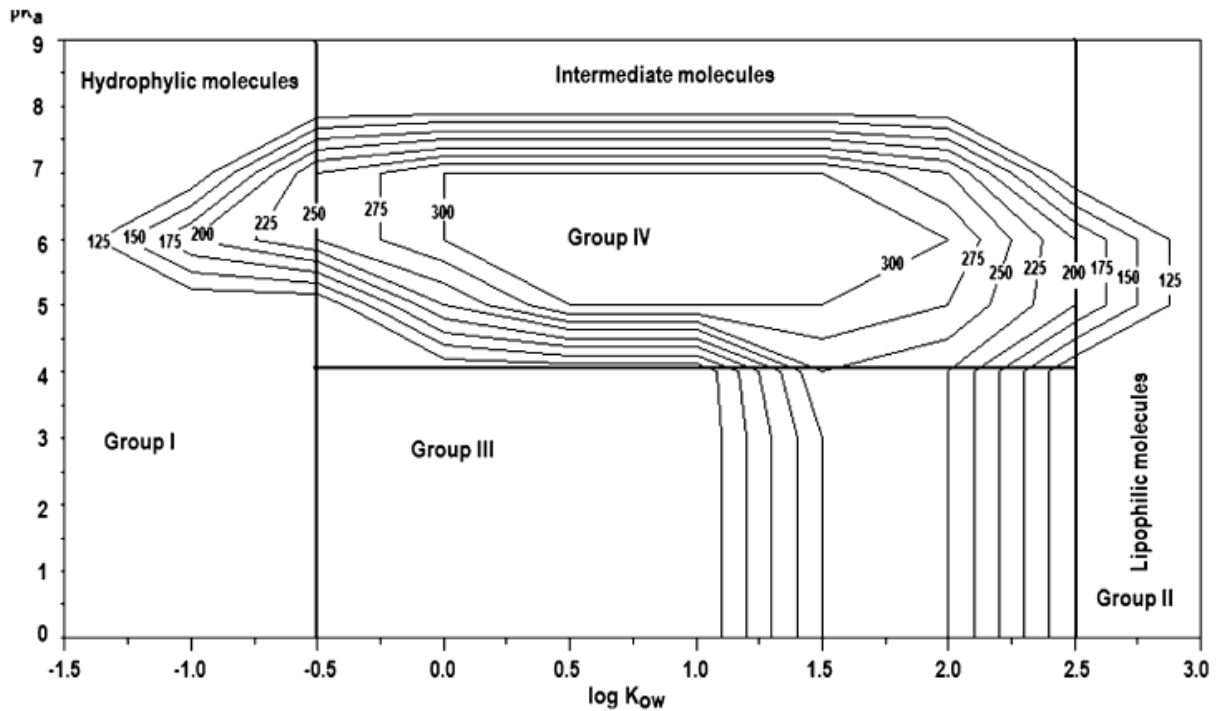
Figura 1. Modelo de predição da mobilidade de xenobióticos



Fonte: Bromilow et al. (1990).

Outros modelos mais atuais buscaram modelar a translocação de xenobióticos em plantas. Um deles é o modelo de simulação dinâmica não linear 'ERMESSE' (Satchivi, 2014) Figura 2, desenvolvido na Universidade de Illinois e que considera outros parâmetros, além do pKa e logKow, relacionados ao próprio composto, à planta (processo fisiológicos, anatômicos e bioquímicos, como conexões entre xilema e floema, espessura da cutícula, permeabilidade da membrana, pH do apoplasto, simplasto e da seiva), bem como informações relevantes sobre o ambiente e solo (umidade relativa do ar, temperatura e potencial hídrico do solo). Por integrar tantos fatores, cria-se uma complexa rede que demanda muitas informações para ser efetiva.

Figura 2. Modelo mais atual de predição da mobilidade de xenobióticos



Fonte: Satchivi (2014)

Apesar da parcial aceitação destes modelos, diversos autores (Satchivi, 2014; Schröder et al., 2007; Trapp, 2004), ponderam uma série de fatores complicadores e exceções de complexa previsibilidade, como a ativação e inibição de genes que podem agir de forma bloqueadora e relativos a própria estrutura do composto. Por exemplo, sabe-se que glufosinato de amônio mimetiza processos naturais da planta e por isso são translocados por mecanismos já existentes. O herbicida glufosinato de amônio é translocado por transportadores de amônio; glifosato por transportadores de fósforo; 2,4-D por transportadores de auxina (Cobb; Reade, 2010).

Por estes motivos, conclui-se que, apesar de importante, ainda permanecem consideráveis lacunas no conhecimento a respeito da mensuração e predição com acurácia da absorção e translocação de xenobióticos.

2.3. Silenciamento gênico em fungos

Silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo conservado em eucariotos que acontece a partir de pequenos RNAs e tem como consequência a supressão da expressão gênica pela degradação de RNAs mensageiros de sequência específica (Nicolás; Ruiz-Vazquez, 2013; Baulcombe, 2015; Axtell et al., 2011; Nunes; Dean, 2012; Villalobos-Escobedo et al., 2016).

O mecanismo de RNA de interferência e sua rota canônica foram inicialmente descritos como parte do sistema de defesa de eucariotos com a finalidade de proteger seu genoma contra ácidos nucleicos invasivos (provenientes de vírus, por exemplo), transposons e mutações (Catalanotto et al., 2002; Nicolas et al., 2003; Nolan et al., 2005). Posteriormente, foram descobertos outros papéis biológicos para o mecanismo, principalmente relacionados a regulação da expressão gênica endógena (Lee et al., 2009; Lee et al., 2010) e também na interação entre plantas hospedeiras e outros organismos, como fungos, plantas parasitas, insetos e nematoides, fenômeno que vem sendo chamado de *cross-talk* ou *cross-kingdom gene silencing* (Knip et al., 2014; Weiberg et al., 2015; Wang et al., 2016).

O silenciamento gênico por RNAi se inicia pela presença de um RNA de fita dupla (dsRNA, *double-stranded RNA*), cuja origem pode ser tanto endógena, como também a partir de fontes exógenas naturais, bem como dsRNA sintetizado artificialmente (Koch et al., 2013; Nunes; Dean, 2012).

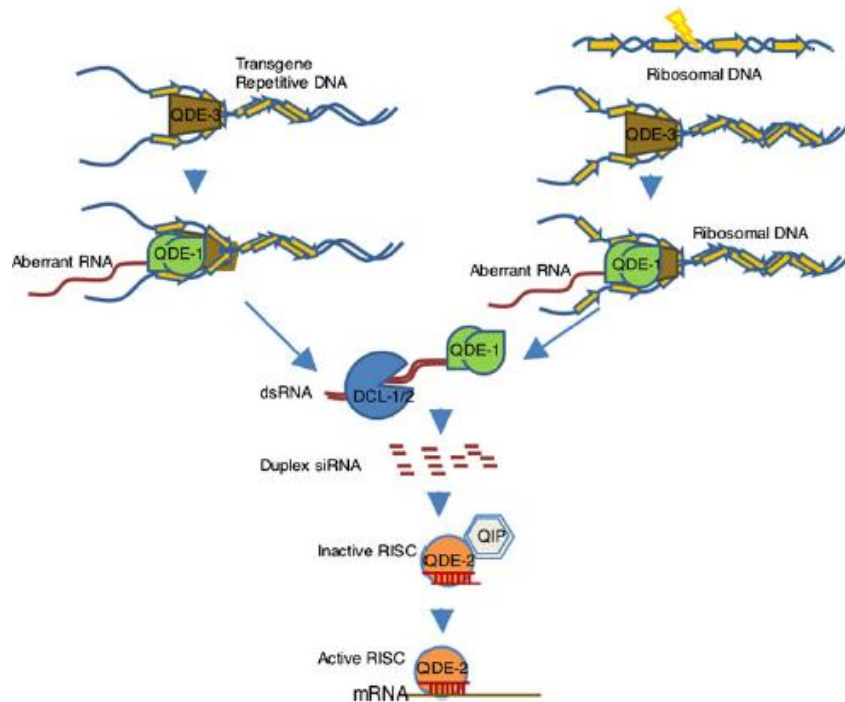
Em plantas, RNAi foi a princípio denominado de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS, *Post-Transcriptional Gene Silencing*) ou *co-suppression*, a partir do trabalho de Napoli et al. (1990) em que o gene codificador da enzima chalcona sintetase responsável pela coloração púrpura em petúnias foi superexpresso e, ao invés de plantas com coloração mais intensa, obtiveram fenótipos variáveis, inclusive com flores brancas. Em animais, o termo RNAi se popularizou a partir do trabalho de Fire et al. (1998) em que ganharam o prêmio Nobel ao demonstrar os efeitos de RNA de fita dupla (dsRNA) no nematoide *Caenorhabditis elegans*. Em fungos, o mecanismo foi originalmente descrito no ascomiceto *Neurospora crassa* e foi denominado de *quelling* (Romano; Macino, 1992).

Um número diverso de classes de pequenos RNA foram descritos nos últimos anos em fungos, além dos mais estudados, como pequenos RNAs de interferência (siRNA) e micro RNAs (miRNA), também descobriu-se *micro-RNA-like* (milRNAs), além de outros que incluem *quelling-deficient-2* (QDE-2)-*interacting small RNAs* (qiRNAs) e pequenos RNAs interferentes independentes de *Dicer* (disiRNAs) (Lee et al., 2009; 2010); pequenos RNAs endógenos (esRNAs) foram descoberto em *Mucor circinelloides*, e LTR retrotransposon-siRNAs (LTR-siRNAs) e tRFs em *M. oryzae* e *Aspergillus fumigatus* (Lee et al., 2009; 2010; Villalobos-Escobedo et al., 2016).

O silenciamento gênico canônico em *N. crassa* foi descrito por Li et al. (2010). Em células vegetativas, o mecanismo se inicia com a geração de RNA aberrante (aRNA) a partir de DNA repetitivo, exógeno ou danificado, que é reconhecido por uma enzima RNA polimerase dependente de RNA (*RdRP*, chamada de QDE-1), e a partir dela sintetizam-se dsRNAs, que são clivados por proteínas do tipo *Dicer-like* (DCL) em duplexes com 21 a 28 nucleotídeos, e a seguir carregados num complexo proteico indutor de silenciamento (RISC - *RNA-induced silencing complex*), cujo componente catalítico principal são proteínas da classe das Argonautas (QDE-2).

O siRNA fita dupla ligado ao RISC é inicialmente inativo. Para permitir sua ativação, a fita passageira precisa ser removida do duplex, o que se dá por duas etapas: primeiro a proteína Argonauta QDE-2 corta o siRNA de fita dupla usando a fita passageira como substrato. Posteriormente, QIP (*qde-2 interacting protein*) é recrutada por QDE-2, reconhece a fita passageira e a degrada com sua atividade exonuclease. Com isso, o complexo RISC é ativado e aciona o pequeno RNA de fita simples remanescente (ssRNA fita guia) para direcionar o silenciamento do RNA mensageiro (mRNA) alvo de sequência complementar a sua, impedindo que o mRNA seja traduzido em proteína, levando a interrupção da tradução. A partir deste ponto, em alguns organismos ocorre novamente a ação da mesma RdRP (QDE-1 ou em alguns organismos também a RdRP-2), cuja função é a amplificação do sinal de silenciamento a partir do reconhecimento da fita passageira como molde e produção de siRNAs secundários que retornam ao início do processo. A Figura 3 ilustra o modelo proposto por Li et al. (2010).

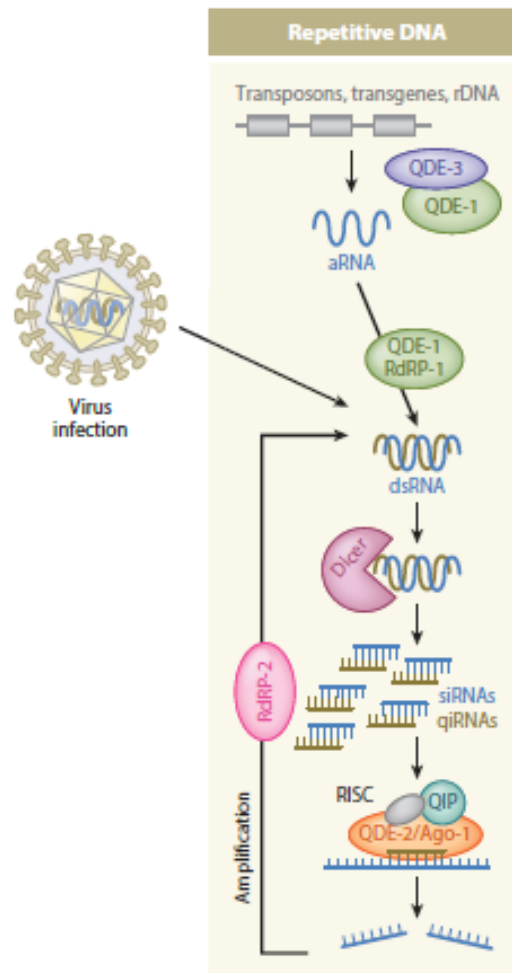
Figura 3. Rota de silenciamento gênico canônica proposta para o fungo *N. crassa*



Fonte: Li et al. (2010).

Mais recentemente, Torres-Martinez e Ruiz-Vazquez (2017) corroboraram o modelo proposto por Li et al. (2010) para fungos e sugeriram que a presença de DNA repetitivo e mutação no DNA são suficientes e necessários para o silenciamento gênico e a produção de pequenos RNAs em fungos por induzir a recombinação homóloga. Também propuseram que a formação de intermediários recombinantes a partir de DNA danificado ou sequências repetitivas produzem aRNA e posteriormente dsRNA. Os demais genes da rota de silenciamento são descritos com proposta de funções iguais, conforme Figura 4.

Figura 4. Silenciamento gênico canônica proposta para o fungo *N. crassa*



Fonte: Torres-Martinez; Ruiz-Vazquez (2017).

Portanto, os componentes principais do silenciamento gênico canônico descritos em fungos e conservados na maioria do eucariotos são: as enzimas da classe das RdRPs, as *Dicers* e as Argonautas.

Em *M. pernicioso*, a ocorrência do silenciamento de genes foi inicialmente descrita por Caribé dos Santos et al. (2009). Neste trabalho, apesar de a rota de genes participantes do silenciamento neste fungo ainda não ter sido caracterizada, partiu-se do princípio de que ela era funcional com base em uma série de estudos com outros fungos à época. Caribé dos Santos et al. (2009) estudaram o estabelecimento de metodologia de silenciamento em *M. pernicioso* e a transformação experimental de hifas dicarióticas com dsRNA longos correspondentes a três genes alvos: *gfp* heterólogo, hidrofobina-3 (*MpHYD3*) e 1-cis peroxiredoxin (*MpPRX1*) com posterior avaliação da redução de mRNA produzido. O silenciamento foi validado pela redução da intensidade na emissão de fluorescência em isolados expressando GFP e

demonstrado experimentalmente que RNAi em *M. pernicioso* é capaz de silenciar vários genes simultaneamente.

A evidência experimental mostrada por Caribé dos Santos et al. (2009) indica que o fungo possui a maquinaria genética necessária para o processamento de dsRNA em siRNA e eventualmente a transmissão sistêmica do sinal de silenciamento. Ainda assim, com o genoma de *M. pernicioso* sequenciado (Teixeira et al., 2014 - disponível em WBD ATLAS <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>), pode ser possível comprovar se homólogos dos genes descritos em outros fungos estão presentes em *M. pernicioso* e em qual fase de desenvolvimento e condição mais se expressam.

2.4. Componentes e função dos genes essenciais do silenciamento gênico em fungos

Em *N. crassa*, identificou-se que os genes básicos envolvidos no silenciamento gênico incluem três 'RNA-polimerase dependente de RNA' (RdRP), duas Argonautas e duas *Dicers* (Li et al., 2010).

Dicers ou proteínas *Dicer-like* (DCL) são enzimas da classe das RNaseIII geralmente compostas pelo domínio *dicer dimerization*, domínio helicase com N-terminal, e dois domínios RNase III. *Dicers* tem a propriedade de reconhecer RNAs de fita dupla (dsRNA) e clivá-los em pequenos RNAs de interferência (siRNA) ou micro-RNAs de interferência (miRNAs) com 21 a 28 nucleotídeos. As *Dicers* são conservadas em organismos eucariotos que retiveram a rota de silenciamento gênico e são encontradas no citoplasma (Carmell; Hannon, 2004). Apesar dos domínios conservados, a arquitetura destes domínios pode variar consideravelmente mesmo entre fungos (Hu et al., 2013).

Outro componente essencial do silenciamento são as proteínas Argonautas. São compostas por dois motivos principais: PAZ (*Piwi-Argonaute-Zwille*); e PIWI, altamente conservado entre eucariotos e exclusivo da família das Argonautas (Liu et al., 2004). O domínio PAZ está envolvido na ligação ao siRNA, enquanto PIWI tem ação de clivar o mRNA guiado pela fita simples do siRNA (Song et al., 2003; Liu et al., 2004). Proteínas Argonautas são o motor catalítico da atividade degradadora de RNA no complexo RISC (Fulci; Macino, 2007). A clivagem inicial é o passo crítico, que

ocorre através da desestabilização do RNA. Em eucariotos, o número de genes codificadores de Argonautas varia consideravelmente, como, por exemplo, de um em leveduras, como *Schizosaccharomyces pombe* a 27 no nematoide *Caenorhabditis elegans* (Carthew; Sontheimer, 2009).

RNA-polimerases dependentes de RNA (RdRPs) são proteínas chaves para o silenciamento gênico em eucariotos ainda que não amplamente distribuídas e conservadas como as outras duas já citadas (*Dicers* e Argonautas) (Calo et al., 2012). As RdRPs compartilham o domínio comum que lhes dá o nome (RdRP), porém outros domínios e sub-domínios são encontrados em diferentes espécies que lhes fornecem diferentes funções (Zong et al., 2009). Em *N. crassa*, a RdRP QDE-1 é responsável por ativar e manter o sinal de silenciamento e age como fator limitante da ativação e amplificação do sinal em função da quantidade de transcritos exógenos que lhes são substrato (Forrest et al., 2004). No fungo Zigomiceto *M. circinelloides* foram descritas duas RdRP funcionalmente distintas: RdRP-1, essencial para a produção de dsRNA a partir de transcritos exógenos e RdRP-2, requerida para a amplificação do sinal de silenciamento a partir do reconhecimento da fita passageira e controlando a produção de siRNAs secundários (Torres-Martinez; Ruiz-Vazquez, 2017). Apesar da importância, a RdRP-2 não é considerada essencial para o mecanismo e não é encontrada em *N. crassa* e outros fungos, mas presente por exemplo nos Zigomicetos *Phycomyces blakesleeanus* e *Mucor circilenooides* (Calo et al., 2012).

Apesar de ser um mecanismo predominantemente pós-transcricional, como descrito inicialmente por Cogoni e Macino (1997), com rotas dependentes de *Dicers* e envolvendo siRNA e miRNA, o silenciamento gênico pode ocorrer também em outras vias transcricionais, envolvendo metilação do DNA, modificação de histonas e silenciamento gênico meiótico no ciclo sexuado dos fungos (conhecido como MSUD – *Meiotic silencing by unpaired DNA*) (Nicolás; Ruiz-Vazquez, 2013). Além disso, são conhecidas pelo menos cinco vias diferentes de silenciamento em *N. crassa* envolvendo outros tipos de pequenos RNAs, como milRNAs, *dicer-independent small interfering RNAs* (disiRNAs), *QDE-2-interacting small RNA* (qiRNAs) entre outros. Isto sugere que outras nucleases específicas reconhecedoras de dsRNA distintas de *Dicers* podem participar da biogênese de pequenos RNAs (Torres-Martinez; Ruiz-Vazquez, 2017).

Mesmo não sendo essenciais, sabe-se que outros genes são importantes para que o mecanismo ocorra em fungos. Por exemplo, Li et al. (2010) estudando *N. crassa* citam RecQ DNA Helicases (QDE-3) e a Proteína de Replicação A1 (RPA-1), que agem a montante da formação do dsRNA, facilitam a ação da RdRP QDE-1 e são importantes para a geração do RNA aberrante (aRNA); e *QDE-2-interacting protein* (QIP), proteína com domínio exonucleico que interage com QDE-2 e ação análoga a proteína C3PO presente em *Drosophila*; sua interação com QDE-2 permite que a fita passageira seja removida e RISC seja ativada.

2.5. Indução de silenciamento gênico pelo hospedeiro (HIGS)

Pequenos RNAs (sRNAs) desempenham importante papel na interação planta x patógeno, modulando o sistema de defesa vegetal, ou até mesmo promovendo a virulência de patógenos em alguns patossistemas (Kumar, 2014; Wang et al., 2015; Weiberg et al., 2014). Evidências recentes indicam que sRNAs de um organismo podem agir sobre outro, em um processo denominado *cross-kingdom gene silencing* (Knip et al., 2014; Weiberg et al., 2015).

No contexto da fitopatologia, alguns exemplos merecem destaque. Weiberg et al. (2013) identificaram 832 sRNAs em *Botrytis cinerea* com expressão aumentada durante a infecção de *Arabidopsis thaliana* e tomateiro. Destes, três foram caracterizados funcionalmente e inibiram diretamente a expressão de genes de defesa específicos da planta. Uma linhagem mutante de *B. cinerea* incapaz de sintetizar sRNAs (*dcl1 dcl2*) apresentou virulência reduzida, assim como uma linhagem de *A. thaliana* mutante para a proteína AGO1 (envolvida no processamento de miRNA e silenciamento gênico) demonstrou maior resistência ao patógeno, sem redução na expressão dos genes-alvo (Weiberg et al., 2013). O sequenciamento do transcriptoma do patógeno biotrófico *Puccinia striiformis* revelou sRNAs expressos durante a interação com possíveis alvos no hospedeiro (trigo), especialmente genes relacionados a defesa (Mueth et al., 2015).

Por outro lado, sRNAs produzidos a partir de transformação genética do hospedeiro também podem silenciar genes de patógenos fúngicos e reduzir sua virulência, tais como o silenciamento in planta do gene *Avra10* de *Blumeria graminis* (Nowara et al., 2010), do *Avr3a* de *Phytophthora capsici* (Vega-Arreguín et al., 2014),

e diversos genes de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *P. graminis* f. sp. *tritici* (Yin et al., 2011) e de *Fusarium* spp. (Ghag et al., 2014; Koch et al., 2013).

Em HIGS, a transferência de RNA se dá a partir do hospedeiro para o respectivo organismo eucarioto que interage (praga, simbiote, patógeno ou parasita). Há, no entanto evidências de transferência na direção oposta – chamado de FIGS filamentous organism-induced gene silencing – como ilustrado em *Botrytis cinerea*, um fungo necrotrófico com várias plantas hospedeiras. O fungo produz RNAs a partir de transposons que são processados por *Dicers* e então transportados na forma de RNAs de fita dupla (siRNA) para dentro da célula da planta, silenciando a expressão de genes de defesa do hospedeiro (Weiberg et al., 2013). sRNAs derivados do patógeno mimetizam sRNAs da planta hospedeira e são translocados até as células dela, capturando parte da maquinaria de silenciamento e reduzindo sua imunidade (Wang et al., 2016).

Até recentemente, o maior impacto de HIGS foi na utilização como ferramenta para análise da função de genes de fungos e oomicetos e essencialidade de determinados alvos para virulência de patógenos. Assim, HIGS poderia ser empregado como ferramenta para a criação de plantas transgênicas resistentes a uma gama patógenos, caso fossem silenciados um ou mais genes centrais de virulência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ensaio com inibidores da AOX

3.1.1. Produção de basidiósporos de *M. pernicios*a biótipo-S

Basidiocarpos de *M. pernicios*a do biótipo-S isolado Tiradentes foram obtidos de vassouras secas de ramos naturalmente infectados de lobeira (*Solanum lycocarpum*) obtidas em Tiradentes, MG. As vassouras foram expostas a ciclo alternado de umidade e seca (12 h cada) para induzir a formação de basidiocarpos. Os basidiocarpos produzidos foram colhidos regularmente e seus estipes removidos e fixados pelo píteo por gel de silicone na tampa de placas de Petri para liberação de basidiósporos sobre tampão de armazenamento (16% glicerol; 0,01 M MES, pH 6,1; 0,01% Tween 20). Após 16 h, a suspensão de esporos foi coletada e armazenada em tubos criogênicos em nitrogênio líquido para posterior inoculação das plantas. A concentração de basidiósporos foi estimada em Câmara de Neubauer no microscópio óptico Axiovert 35 (Zeiss; Jena, Alemanha).

3.1.2. Produção e condução das mudas de MT

Sementes do tomateiro 'Micro-Tom' (MT) foram semeadas em vasos de 250 ml contendo vermiculita expandida. Após 7 dias da semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos de 250 mL contendo solução nutritiva padrão de Hoagland; Arnon (1950) a $\frac{1}{4}$ da concentração.

Os vasos contendo as plantas de MT foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura constante de 24°C e fotoperíodo de 12 h. A solução nutritiva foi trocada semanalmente, aumentando-se a concentração da solução gradativamente até se atingir 100% da solução padrão na segunda semana após o transplântio.

3.1.3. Tratamento com inibidor da AOX '7j-41'

Sete dias após as plantas serem transplantadas para a solução nutritiva, foi adicionado o composto inibidor da AOX com a maior atividade biológica sobre *M. perniciosus* (Barsottini et al., 2019), denominado de '7j-41' na concentração de 250 µM.

O desenvolvimento deste composto está sendo feito com base nas propriedades fungicidas das estrobirulinas e de outros inibidores da AOX, em parceria com o Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob coordenação do Prof. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (processo FAPESP 15/07653-5), do Instituto de Biologia (IB) UNICAMP, e, sendo eficaz, o composto será protegido através de pedido de patente.

3.1.4. Dissolução do inibidor da AOX '7j-41' em água

O composto foi dissolvido previamente em 10 µL de DMSO e agitado em vórtex. Posteriormente, foram feitas tentativas de dissolução da solução '7j-41'+DMSO em água com os seguintes compostos e concentrações: nonil fenoxi poli etilenoxi etanol (marca comercial Agral) (0,02%, 0,05% e 0,50%), Etanol 100% (0,10%, 0,50% e 1,00%), KOH 1 M (0,12%), Silwet (0,02% e 0,05%), Triton X-100 (0,02% e 0,10%) e Tween 20 (0,02% e 0,50%). Essas soluções de adjuvantes foram então colocados em contato com plantas de MT com 7 dias de transplante em solução nutritiva, e deixados por 1 e 2 dias para avaliação visual de possível efeito fitotóxico, como redução de porte, necrose e eventualmente morte de plantas.

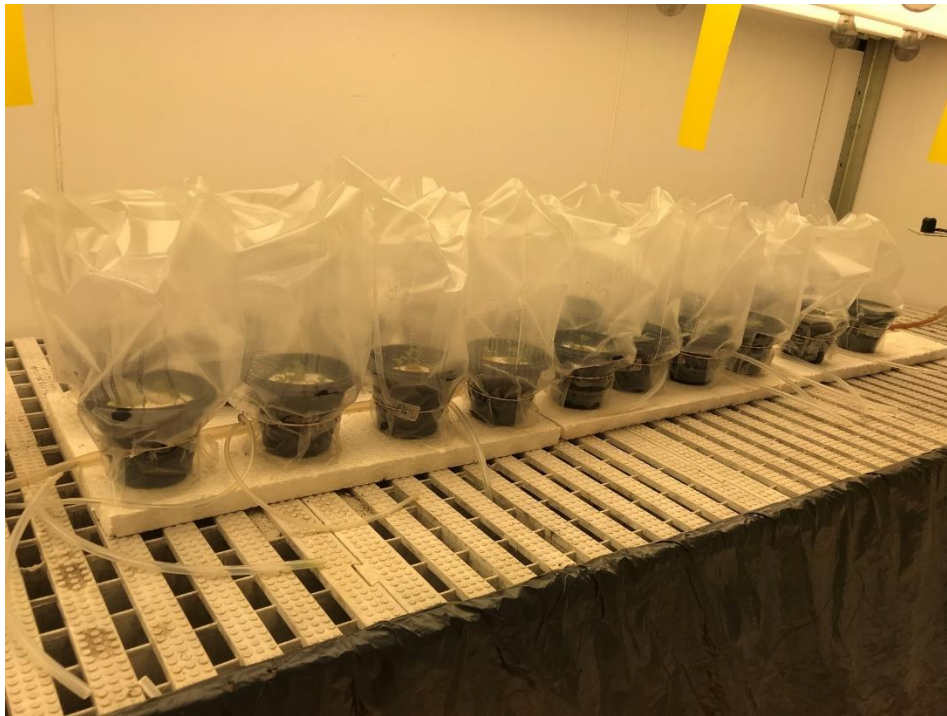
Baseado nos resultados obtidos de solubilidade e fitointoxicação, optou-se por usar como agente solvente do '7j-41'+DMSO, o espalhante adesivo nonil fenoxi poli etilenoxi etanol (marca comercial Agral) a 0,02%.

A solução de '7j-41'+DMSO dissolvida em 0,02% nonil fenoxi poli etilenoxi etanol foi então adicionada à solução nutritiva padrão de Hoagland; Arnon (1950) a ¼ da concentração, e mantida em contato com o sistema radicular das plantas de MT por dois dias. Após este período, toda a solução nutritiva foi trocada, as raízes e vasos lavados com detergente neutro e água corrente. O conteúdo da solução com o composto foi devidamente descartado na seção de Resíduos do CENA/USP.

3.1.5. Inoculação com basidiósporos de *M. pernicios* biótipo-S

No mesmo dia após a troca da solução, as plantas foram inoculadas com esporos de *M. pernicios* biótipo S usando uma micropipeta no volume de 60 μ L da suspensão de basidiósporos na concentração de 10^5 , aplicando-se nas regiões meristemáticas (apical e axial) de cada planta. No período 24 h antes e após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 h com sacos plásticos umedecidos (Figura 5).

Figura 5. Plantas de MT mantidas em câmara úmida por 24 horas antes da inoculação com basidiósporos de *M. pernicios*



O experimento foi delineado de forma inteiramente casualizada, cada vaso contendo quatro plantas e dezesseis vasos no total. Cada vaso continha uma planta de cada nas seguintes condições:

Tratamento 01 - não tratada e não inoculada (Controle);

Tratamento 02 - não tratada e inoculada;

Tratamento 03 - tratada com '7j-41' e não inoculada (Controle não inoculada);

Tratamento 04 - tratada com '7j-41' e inoculada.

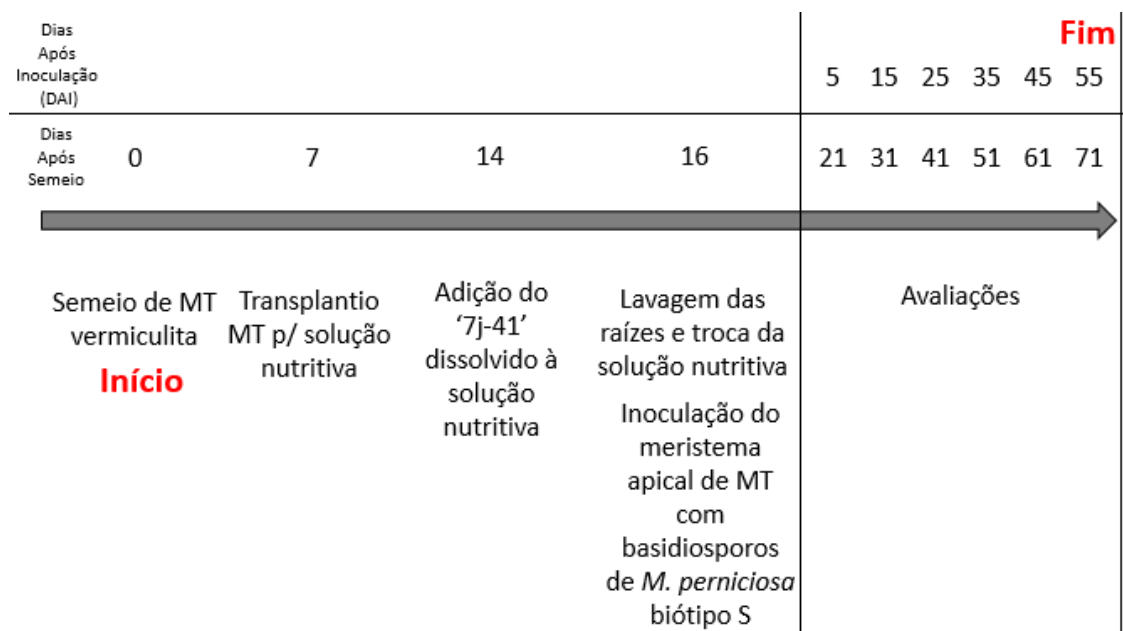
3.1.6. Avaliação da infecção e dos sintomas de *M. pernicios*a biótipo-S

A avaliação do surgimento de sintomas se deu cinco dias após a inoculação, sendo realizada a cada dez dias até os 45 dias após a inoculação. Avaliou-se o sintoma típico da infecção de *M. pernicios*a em MT (engrossamento do caule) com paquímetro eletrônico logo acima do ponto de inoculação; altura da base das plantas até o meristema apical; ocorrência do fitopatógeno pela observação da sua sintomatologia (superbrotação, clorose e ocorrência de vassouras laterais verdes). Ao término do ensaio aos 55 dias após a inoculação, avaliou-se destrutivamente a biomassa das plantas, pesando-as separadamente em caule, folhas, frutos e raízes e também contagem de frutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 16 repetições. Os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para normalidade, Bartlett para homocedasticidade e atendendo ambos usou-se o teste F para análise da variância. Posteriormente, em caso de significância, fez-se a separação de médias pelo teste de Tukey a 5%, utilizando-se o software Agstat (Written for Zeneca Ltd, Updated by Syngenta 2001).

Um esquema com a sequência cronológica das etapas do experimento pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6. Cronograma simplificado com as etapas de condução do experimento com o inibidor da AOX '7j-41'



3.2. Desenho da rota de silenciamento gênico canônico em *M. perniciososa*

A partir do acesso ao banco de dados genômicos e de expressão de *M. perniciososa* (Teixeira et al., 2014 - disponível em WBD ATLAS <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>), foram buscados os genes descritos como essenciais e/ou importantes para a rota de silenciamento gênico canônico empregando busca por palavra-chave, como “*Dicer*” ou “Argonauta”, por exemplo. Foi elaborada uma lista com todos os genes candidatos agrupados pelo tipo de gene que codificam, de acordo com o descrito por Lee et al. (2010) e Torres-Martinez e Ruiz-Vazquez (2017).

Definiram-se seis agrupamentos em que os genes poderiam ser classificados como potenciais componentes da rota de silenciamento canônico de *M. perniciososa*: RecQ helicase, *Dicer*, QIP, RPA-1, Argonauta, e RdRP. Após a busca, anotou-se o código do gene, sua sequência de nucleotídeos e de aminoácidos. Utilizou-se a ferramenta *Basic Alignment Search Tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar a similaridade e identidade entre os genes encontrados e os já descritos em *N. crassa*.

Com os genes mais prováveis selecionados a partir de palavra-chave e BLASTp, adotou-se a ferramenta MAFFT (Kazutaka et al., 2017 - disponível em <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), para realizar o alinhamento múltiplo global das sequências de aminoácidos e analisar visualmente se as sequências de aminoácidos que formam estas proteínas preditas estão completas e observar seu nível de similaridade.

O próximo passo consistiu em observar quais domínios estão presentes nas proteínas codificados pelos genes de *M. perniciososa* e comparar com as descritas em *N. crassa* por meio do site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Domínios são unidades estruturais, funcionais e evolutivas das proteínas e por isso, analisados individual ou conjuntamente são indicadores de qual função ou interação que aquela proteína pode exercer (Lodish et al., 2014).

Os genes que apresentaram semelhança com os de *N. crassa* nas etapas descritas acima foram submetidos a análise de expressão usando o banco de dados genômicos e de expressão de *M. perniciososa* (Teixeira et al., 2014 – disponível em WBD ATLAS <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>), visando entender em quais

condições biológicas estão sendo mais expressos a partir dos dados de sequenciamento de RNA e apresentados como RPKM (*Reads Per Kilobase Million*).

3.3. Transformação de tomateiro MT para expressar *Dicers* de *M. perniciosa*

3.3.1. Busca de sequências de *Dicers* para silenciamento gênico de *Moniliophthora perniciosa*

A partir do acesso ao banco de dados genômicos e de expressão de *M. perniciosa* (Teixeira et al., 2014 - disponível em WBD ATLAS <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>), foram buscados genes associados a maquinaria de processamento de dsRNA em siRNA, particularmente *Dicers* descritas em outros organismos.

Para identificar onde os pequenos RNAs de interferência (siRNA) formados se parearão sobre uma sequência de RNA mensageiro (mRNA), usou-se o software *GenScript siRNA Target Finder* (<https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder>). Isto é importante pois alguns componentes do mecanismo são altamente conservados em eucariotos e o seu silenciamento pode impactar em funções vitais à planta que se visa transformar.

As sequências dos genes codificadores de *Dicers* identificadas e recuperadas nos bancos de dados foram utilizadas para a construção de *primers* específicos usando o programa *Primer3* (Untergasser et al., 2012, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), ao passo que para verificar a qualidade dos primers desenhados foi usado o programa *Netprimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).

3.3.2. Construção de vetor de siRNA

Visando obter uma linha transgênica de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' expressando siRNA para silenciar *Dicers* de *M. perniciosa*, foi realizada a clonagem de fragmentos das *Dicers* de *M. perniciosa* para posterior recombinação em vetor de silenciamento e transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens*.

A partir da identificação das sequências de *Dicers* de *M. perniciosa*, foram desenhados *primers* específicos para clonagem de fragmentos com tamanho entre 200 e 300 pb (Tabela 1).

A reação de amplificação do genes *Dicers* foi realizada utilizando 1X tampão, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 U de HiFi *Hot Start High Fidelity Taq* polimerase de alta fidelidade que possui atividade exonuclease (Kapa Biosystems; Cidade do Cabo, África do Sul), 0,4 µM de cada *primer*, 10 ng de DNA de *M. pernicioso* (biótipo-S, isolado Tiradentes). A ciclagem de PCR foi realizada com denaturação inicial de 3 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 50°C por 30 s e 72°C por 1 min, e extensão final de 5 min a 72°C. O produto de PCR foi visualizado em gel de 2% agarose e tampão TAE em exposição à luz UV. O fragmento foi recortado de gel com bisturi e foi conduzido à purificação utilizando kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido). O fragmento de DNA purificado foi quantificado em fluorômetro *Hoefer DyNA Quant 200* (Hoefer Inc.; Holliston, MA, EUA) e utilizado nas etapas seguintes da clonagem.

Tabela 1. Sequência completa dos genes e *primers* (*forward* em verde e *reverse* em vermelho) e tamanho do *amplicon* (sublinhado) das três *Dicers* (MP14055, MP10442 e MP01869) de *M. pernicioso* usados na clonagem

<i>Gene Dicer</i>	Sequência	<i>Amplicon</i>
MP14055	<p>ATGTCAACTACCGACCTCCTCCCTCGGCGGTATCAAGAAGAAA TCTTCACTCAGGCCAGCAAGAAAACATCATCGCCGCTCTCGG TACCGGTAGCGGCAAGACCTACATCAGCACCCTTTTAATTTAA TGGATGGCTACACAAGATGGTGCTCGAGGGAAAGCAATCGTTT TTCTTGTTCCCAAGGTCCCGCTTGTTGAGCAGCAGGGTGATTT CATCGCGAAACATTCGGCTTTACGCGTCATCAAGTTGCATAGC ACGATTCGCTCGAGTTGACGGACAGAGAAGGATGGGCAAGG ACATTTGCAAAGTATGATGTATTCGTTATGACTGCTCAGATCTT TTTGAACCTGTTGACGCATTCATTATGGGGGCTTAAACAAGGTC TCTCTACTGGTCTTTGATGAATGTCATCATAACGCGAAAGAACCA TCCATAACAACGGTATCATGCGAGAATACATGCTCCTTTACCA GAAGATCGTCCAAAAGTTTTGGCTTGACTGCCTCACCTATAC AGAACGCAAAGAATCCTCTCGTTTCTCTCAACGAACTCCAAC CAACATGGACGCACGAGTCATTGGTGTACTGGATCATGTGAT GAGTTGGCGCAGCACACACCGAAACCCGTTGAGGTTATCCAA GAGTATTCATTTCACTCGAACAATCTAGCTATCCCGAACCTTC GTTATGGTTCGTGTATCAATGTCTTTGATCGCGCAACTCTAACA GCCATAGCAGAATGCTGGCCGGATATCGAACGTCGATACCAC GTCACCCTGGGCAATCTTGACCCTACTGCGCGTCTCTATATC TCTTCATGGAGATGAAAACATCATTTCTGCATTCTACCAACCT GATCTCAATCCAGTTTTAGCGATGACCTCGTTGTCCATGTCC CGCACACAACGTTGGAAGATCTTCCAGAACATTTTGACGATAT CGTAGACATTCTCGTGGACTACGAACAGTTTT ATAGCGTTCGA TCCGACTACTTTCTTCTACCTTCCACAGTACCTTTGGAATGGTG TACACCCAAAATCAAGACACTGGTGGATATTCTGGTTGCGCAT TACACCCCAACCTTCCAAGGCATCATATTCGTTGAACAGAGGC AGGTAGCGACATGTCTGGCTGGGGTGCTCCCATACATTGAAG AGTTGAAAGGATTGGTCAAATGTGGAGACTTTTTTTGGGAATGT TAATGACGTCGAGGAATC CTTGAGAGGCACCTTGAATGTAGT</p>	264 pb

CGTGGGCCAGACGTGGTGAAGCTTTTTCGAGCAGGCTCAATC
AATCTTTTGATTGCGACCTCTGTCGCTGAAGAAGGGCTCGATT
TCCCAGCGTGCACATTGTCATCCGCTTCGACCCCTCCAACA
CATGGTAGCCTACGTTCAATCCCGCGGCCGCGCCAGAAACAA
AATCTCCAAATTCATCATCATGCTTCCTGAAGGCGACGTCATTT
CAAGAGCGAAATACGAAGCGTTCCTGCAAGCTGAGGTGCACC
TTAAGGACATCTACAATGTCTCTCGGCCTCCAGACGACGCTAT
GGACGAAGATTCCGACTCGGAAGCGGACGAGGAGGTAGAGCT
GGATACGCAAGACCGTGAACGATACGTCGTACCCCATACATC
GGCATTATCAACTACGACAATTCCATTGCTCTCTTGAACCACC
TATGCGCACTTATCCCACGCGACCTTTACACCGCTCCCCACGT
TCCAGTATACACGGGAGACTTTCAAGCCACGTTGGATCTTCCA
GCCAGTTTACCCCTCCATCCGAACGATCTATCGTATGAAGGAC
CATTGAAGCACTCAAAGAAGGAGGCAAAGAGGGCTGTAGCGT
TTAAAGCGGTCAAGAGGTTGAGAGTGTGGATGTTTTTGATGA
GTATCTCCTGCCGGTAGCTTCTGAGAATGGGAAAGCGGCGGA
AGATGTGGATAAAGAGGCCGCTTTTTGACTATGAAGGGATTCCG
GTGATGATGGATGTCTGGGTTAGAGACCCGTGGGGCTTGGGA
AACCGGGACAGGCTTTGGATGCACCCGGTGTATATGAATGGT
GGGTTGGTGGCGGGGTTGGTCACTGGCACGTTGTTACCTGTC
GTGAAATTTGAGACCTTCGAGATGGGTAGAGGGAATCTGTTGG
TGTTTGATAAGGAGGAAGAGGGCATAACAAGAAAGATGTTGGA
GGAGTATACTCGTCTAGGCATTTGGCATATGGTGACGACGATT
GCGCTCGCTGCTGCACCGAGCTTGTATCTTGTCCCGTTACG
GACGCGCTGGAACCCGACTACGAGGTGATCGAGCGTCTGTTA
TCGCATCCCAAAGGCGTGCGAGATTGGACCGGGATCACAGAA
GCAGATTATGGACGTACGCTGGTGGCGAACTGCAACCAACGC
GGACGGACCTTGCTTTTGCATAAGATCCGACATGACCTTTCGC
CAATGTGCGCTCCACTACCAGGCTCTGAAGGAGCAGAGTACG
CGTCGTAACGAACTACCTCAATCGGTGGACACGGAAAAG
GTCTGGAGATCGCTCAAATTTGACGCGCTTCCTTCCAACCTGAC
GGCCACATGATCGAGGTTTCGGCTGCTCCTCGAATTTCTCGG
GGCTGTACCCTCTTACGTCCACGTCTGGCCCATCCACGAAACC
CACAACCGTATCAGAAACCTGGCTCATCCCCAAGGCTGCTGT
TCGTGGCTCCCCATTTCCGAAACCATGTTCTCACTTGGCGAG
CGCTCCCAGTCTATGTAACGCATCACCGATATCTACCGAGC
GCGGGAAGCCAAATTTGCACTTGGACTACCGCCTATCAATGAT
ACACTACTTCTCAAAGCACTTACTATCCCGGCTGCCTCCGCTG
GATGGAACAACCAACGATTAGAACTCTTGGTGATGCGGTTTT
GGAGTTGTGCACAACCTGTTCACTTGTCAACAAGTACCCGAT
AAACATGAAGGCCAACTAGACCACCTCCGTCCGGCGAACATC
TCGAATCGTTTTTGTGTTTCGAGGGCGTTGGAAGTTGGGTTGG
AGAGGTTTCATCACGAGCGAGAGTCATAAGAAGGCGAGGGCGT
GGAGGTATCTTGAAGTTGAACCGGAGAATAGACAGGGGAAGA
GGATGGTGAAGCGGGCTTATCCTAGACGAAGTCTGCAGGATT
GTATGGAAGCGTTGGTTCGGAGGCGCTTTTGGAGACGGGTGGTA
TACCGATGGCGTTACATGCAGGTGTTGCTTTAGGGCTTGGGTT
TGGAGGATTGGTCCCCTGGTCGATGCGGTATGAACGGGCACA
GAGGGTTCCAGTTTCGCCGATGTTTGAAGTTTAGAGGAGAGT
TTGGGGTACAAATTCGTAATGGAGAGTTATTGCGAGAAGCGG
TCACACATCCGTCATTCTCGTCATACTCTGCAACATCATCATAT
CAACGACTCGAGTTTCTTGGGGATGCTATCCTCGACCTAGTCG
TCATTCACTACCTTTACAAAAAGTTTCCAAGTGCAACATCCCAC
CAACTCGCTCTTCCACGTACCAAAGCCGTCTGCTCACCTGCTC
TGTCATCACTCGCTATCCGCCACCTCCAGATCCACAAAATCAT
ACTCATCAATAATGTGGAGCTATCCACGGCTATCGCACAAATAC
GTGCCCTCATCTCGAAGCAGCATCAGCAGCAACGATCGTACGC
GACGGGTGGCGATACGACCCCCCAAAGCTATTAGTGATGTA
TTCGAAGCTATCATGGGAGCAGTATTCATCGATTCTGGGTACA
ATTATGAAGTAACGGCTGGTGTGGTAGAACGAGTCATGCAAGA

AGTGTGGAGGTGTTGAGTCCCACTGTATGTTTGGATCCAGTG
 TCGATTTTGACGAAATGGGTCGCTGGGAACAAGTGTGCGCTCA
 AGGTTGAGTTTCGACCGCAAACCAAGGAAGCTGGCGATCGCG
 AAGGGATTGAGGCGAGGCTACATGGAGTTTTACTCGCAGGGC
 CGATTGTATCAAATAGTATGTCTGTGGCAAAGAACATGACCGC
 TGAGAGGGCACTGGATGCGTTGCAGGAGCTGGGTGGTGAGAA
 GGCATTGGTCAAGATATGTACATGTGCAGTGGCAAAGGTGACA
 GCAGTTACCTCAGCGATGGAACGCTTAGGAGACGAGATGGCG
 ATCGGTATGGATATCTCAGTGAACACGGATCCTGGTGAAAAGG
 GAAAAGCGGGTACGGTGTGA

ATGGATAATGGCCCGGAGACATTCACGACGCGTGGATATCAG
 CAGGAGATGCTGGAAGAAAGTCTACGCCGCAATATCATCATAG
 CGATGGACACTGGTTCAGGCAAGACTCATATCGCAGTATTGCG
 TTTGAAAATAGAAGCTGAGCGTGAATCACGCAAGGTCTCCTGG
 TTTTCGCCCCCAATGTTGCCCTTTGTGAACAGCAGTATAATGT
 CATCAAAAAGGCCTTGCCAGCACCAAGTAAACGATCATTACAGGG
 GCCTCGGAACCGAACCAATGGAAAGACCAGGATCTGTGGAGG
 AATGTGCTTAGGGATTGGCGAGTGGTGTGTCTACACCTCAG
 GTCCTGCTCGACGCCCTGCGTCATGGCTACATCGTTATGGGC
 CGTGACATTAGCCTCATGATATTTGATGAGGCCCATCATGCAT
 CCGACAAGCACCCATATAACCTGATAATGCAGGAGTTTTACTTT
 ACCATCCCTCGACGAAGTCAGGGTACCTCACCTGGCGGGTCA
 GATCTCATTCAACCAATGGTCATGGGCCTGACAGCCAGTCCTA
 TTTTCGGAGGAAATGTTGATATTGCTTTTAGGAAAATCGAGGG
 AAATCTCGACAGTACTATTTGCGCTCCCCGACGTCACAGAGAA
 GAGCTATCGGAACATGCTCATCGTCCTATATTCAAACATATCCT
 ATACGAAACCAAAACCTCCTTCTCCACCAATCTCGCAGCTCTT
 GACGCAGCGGTGAGCGAGCTCAACATTGAAAACGATCCCTAC
 GTCAAATCTCTTCGCAAAGATCTCGCAAAGCGACCGCCGGTT
 CAGCGGATTACGACCGCATAGATCGAAAGCTCTCCAAGTTAT
 TCACAAACAGGACTCCTTCACGCATAAAGGTCTTCGCGACTTT
 TCTAGTGCCGCTCATGCTATACTAGATGACGTAGGCTCTTGGG
 CGACAGATTGGTTCGTCTGGGAAGTCATCCAGCAGGCTAAACT
 TGCTGCGGGTCTCTTAAACATGTTATGAAGACCTGGAAAGTA
 CAGGAGAAAGTGTACCTCCTGTCCATTTTAGACAAGATATCGG
 TGATGCCTCCGTCATATGCTCCCGAAGATGTCGCTGGTGATTC
 GTCGGATAAGGTTGCGGCTCTGGTGGAGTGCCTGCTTTACGA
 GAAGGAACTAGCCGAGAATGGGAATGAGATGTTGTTGGCCT
 GGTCTTTGTCCAGCGCCGTGATGTCGTCTTGGCGTTGAAGGA
 GCTGCTGAGTAGCCATCCTGTCACGGCGGCGGAGTCCGTGT
 AGGATCACTGCTCGGGACCTCAGAGAGCAGTCATCGTCATT
 GATGATGGACATTACTCGACGCCTAGCCAAAGAGACACAAGAC
 GACACGTTAATGGACTTCAAATCGGGGAGAAGAAGTGTATCG
 TATCGACTGCTGTTGCAGAAGAGGGTATCGACGTTGAGGCTTG
 TGTTGTGTCATTAGATGGGATTTGCCTCAAATATGGCTTCTT
 GGGCCAGAGTTCGTGGCCGAGCTAGGAAGAAAAGGAGTACAT
 TCACACTTATGTTGAGAACGGCAGCGGCAATGAACAGAACGT
 TATGAAATGGCAAAAACCTGGAACAAGAGATGGTTGCTAAATAC
 TACGACATCTCGAGAATAGAACCGATAGAACCAGCGTTGATG
 ATATTGAGGAGGATGACTGGGAATTCCGCATAGGCGCTACCG
 GCGCTTGTCTCACTCTACAATCTGCAATTCCACACTTGAACCA
 CTTTTGTGCCGTCGTATGCCGAGGAGTAGAGCACAAAGCTTTA
 TATGAGCTTGACCCTCCTGAATACCCTCTCGGATGGCACTCGT
 TCAGTTCACAATCTCAAGCCGTGATGCAGTACCAAGGTCCTTG
 GGCATCCATTGTTACATTACCCCGCTTTCTACCCGCAGAGCTG
 CGTGTGTTCTCCACGGAACCGGTCTATATGTCAAAGTCTCTG
 CACATAGACACGCAGCATTTCAGGCATATCGCTGTCTATACGA
 ACACGAGCTTCTTAATGAACATCTCCTTCTATCGTTGATGACG
 ATGAGGAAGTCCGAGAGCTCAAGAAGGCAGTCGAGCAGCGTA
 TGAGTACGGTGGCGGTATCAAAGCAGATGGATCCTTGGACTG

MP10442

261 pb

TCGATGACGAGGCATTTAGCGGGTGGTATTGGTCGGAGCTGA
 TCATTGGTGACCTTCCACCACTACACTTCTTCTCTCGGGTTAAG
 CCCGTTGATTGGTCTTCGGCCACCGGACCTGTACTACACATGT
 CAGTCGCAGAACAGATGGTTATTCAACTACGGTCGATTGGCAC
 AATCGAGGACGACGATAGACGTATCATCGATGCTAGAGGCTAC
 ACATTTTTGCTCTTCTGCGCCATCTATGGATCCCGTATGGAGG
 CGAACAATCTCGATTTCTCGTACCTGCTACTCCCTGCCGAGA
 CTTGAGAGAACCAGCATGGGAACACCGTGCATCCAGGATGAG
 CACAACCTCAGCATTCTGAAGAATCCACAGGATATCTTCAATGCC
 AATGCTAGTGTATTCGGTGAAGAGTTCGGGTATCCGACAGACA
 TCGTGTTTCGTAGAGATGGGGCCAGTTTCTTAGGCCATACAA
 GTTTGTGCGGTGGAGATTTGAATCTGAGCCTTTGAGCGTAGAA
 GAAGAAGAGAAGATCCGTAGTTGAAACGTTATGCAAAGGAG
 GACAGTTTAGAAATTGCATTTCCCTTGTGCTCGTGGAGCCGT
 TCTCACGTGCAACCAATTTTTGGTTCCTTTCCAACTTCTGCT
 AAACCTGCACCGCCAGCCATCGAACCAATCCTGTTGATAGCTG
 AACTTTCTACAATCACAATGCTTTACCGACTGAAACACGATAT
 GCCTTACTTCTTCCATCTGTTCTGCGTGCTATCGCCGTCGCCA
 TFACTGTTAAATCT **CTTCGCACTTCATIGTTTTG**CGCTACGCCA
 CTGTCTGAGATACCAAACGATATCCTGACTGTTGCTATCACAG
 CGCCAGTCTCTCAGGAACCCAAGAATTACCAGCGTCTTGAAAC
 CTTGGGGGACACCGTTCTGAAGTTCATTGTCTGCATCCAGTTA
 TTTCGATGAATATCCCTGTTCCCTGAAGGTTATTTGACCATGC
 GGAAAGATCATTCTGTATCAAACACTCGATTGGCCAAGG **AGAA**
TATGGAGCGAGAGGTCTTCAAGTGGGTCATCCGAGACCGCAT
 ACTTGGGAAGAAGTGGAAAGCCGAATTATATGACGTCCAAACTA
 CCTGAAGCACTTGCTCCTATCCTAGACCAAGAAAGCGCAGAAG
 CTGCAAACAGTGGCACAGCAAATACCGAGAGCGCGACGACAG
 AGAAACGCTCTAAGAAGAGCAAGCAAGAAATGTCTACAAAAGT
 TCTTGCAGATGTCATAGAATCATTGATCGGCGCAGCTTACTTTC
 ATGGCGGTTTTGACCTCGCCTGTGAAGCCACCAAATTTTTGA
 CCTCGGCTTGAAGCAGTGGCAGCCTCTCCCTACTCGTATCAAG
 AGCGTTCTCGGACGAGCCGACCGGAGTGAGCTAAATGGACTA
 CAGCTCCCTGAGCAGGTCAACTATGTGGAGACAATCATCGGA
 CACACCTTCAAACGCAAGTTGCTTCTCGTCGAGGCTTTGACCC
 ATGCGAGTCATCAACAGGATCTCGGGACCGTTTCATATGAAAG
 AATGGAATTCCTTGGAGATGCGGTGCTTGATATGATCGTCAAC
 GATTACTTGTACCGGGCGCCTGAAAGGAATACAGTCCAGGC
 CACATCTACCTGCGCAAGGTTGCTGTTGTCAACGGTCAATAC
 TGGCATTCTGCTTGAAGGCATCCCTGACTATTGAGGCCGA
 AATGCCCGGCCTGATGAAACTGGAGCCATATCCGTGGTAGA
 TGAACAGCACACTGTTTCACTATTCAAGTGCCTGCTCCATAGC
 AGCACGCACATTCTTGAGGAACAAGACAATACCTGGGCCCGTT
 TCCGCCTCCATCGCCAAGAAATCGAAGAAGATTTGTGCGGAAGG
 CCAAATCTTTCCATGGGCGGCGTTAACTCAATTACAAGCGCCA
 AAATTCTTCGCTGACATGATAGAAAGCATCATTGGTGCTGTTA
 TCTGGATACCGAAGGGGACCTGGAGGTGGTGCCTCGGTACT
 ACGCAATCTAGGTTTGTGAGATTCTGGAGAGGATTGTCCGA
 GAGGGCATCGACGTTTTACACCCAGTTTCTCGACTGTCCATGT
 GGGCTTCCAAGAAGGGGAAAAAGATCGAGTACCATTGAGATC
 GGGAGTACGGCAACGTCTACTGCTCCATCCTTGTGACGAAGA
 GGAAGTGGCACGTGTTAGTGCCAACTATCATGGCAATACCAGC
 AAAGAGGAAGTACGACTGGCTGCGGCTGAGAAGGCGATCAAG
 ATTCTGCATCTGCGGGATGTCGGCGCCAACCTACAATATATTGA
 AGAAAGTAGAGGGTTCGATGA

MP01869

ATGCTGAATATTTGAAACAGAGGTGAAAGGCGAAAAGTCAG
 AGGCTCCAGACGTCGGTGGACCTGAAGACAATGCCGATGTTG
 AAAGCATTGTAACAGTTCCATCTACAGGAGAGCCTTCTCCAG
 CAAGCGTCGTGCAAATAACGAGGAAAAGTCGTCTCGTCCGAAA
 AAGAAACAAAAGGTGATAGACAGTGGAGTAAAAGGTCAAGCGT

237 pb

CGAGCTGCAGTCCCCTGAGCTCACTGTTCCCTATGACCATCA
TATCGAACACGAGGGTACCACCATACTTTCCACAATCAACTA
TTCGCATATCTGGGCAAGCAACACAGCGTCAGCTTGCCTCTC
CCATTATGTCTTGTCCGAAATAGGCCATGGGCTGTTGATTGG
GTCTGGAAGCACGCTTGAAGACTGGTGTCTGGCTAGAGAA
TCCGAAGTTTTCTCTGTGGTCAAATCCTGGCCAGACATCACGC
CAAATCTCGACTTATGTTCTGATGAATTC AACCTATCTCCAAAA
GTCGTGAAACTGGTTCAGCTCCTCAAATCTTGTCAGCATTATG
GCAAATCGTTTTAAAGGGATTATTTTTGTTCCGCCGGCGAATCGT
CGCCTTGGCTCTCACAGCACTCATCAAAGCGCTCGGTGAACAT
CTAGGTTTTCTTGCAACCTGTCGCTATGTTTCACGATAGTAGTAA
ACAGGCCTTGAAGTCACTGTGAACTTGCAACCTAGTT
ATAGCCACACGGTCTCTTGAGGATTTGGAAATACCTAAAGTGA
AGGTATTGATCTACTATGATTTATTTGACAGCCACATCTCCAAA
GCCTATGCGCATAATTGCTTATGCGATGAAAACGGCTTTATATT
ATACCTGACACAGAACAAGTACGCCAGACATCGTAGGATGCTG
TCCCGAATTTCCAGACCAGTTCCGGCACTCCGGCAATGGGCC
TCAACCTTCCCTTACCCAAGTGAAGTGTGTGCCTCCCGAAA
TACAACAAGACCCTATAGATTCTTATCTGTCAGATAGCGACGAA
GAGGATGATACCATAACCGAATACATTAAGATGCGACCACTG
GTGGCCTGATAACGCCTAGAAACGCTACAAGCGTTCTTTACAG
CTTTTTGTCCCGACATGGTTCAGCCGTTCCGAGCTACAAATCT
CTTTTTGAGTTTGACGAAGTAGGGGGTGGTTATCTCAGAGGCT
ATACATGTCGGGTGGTCTTCCAGGCCTCCCTATTGATTGTCC
TTGGTCCTCCGTTTCCACATCCAAAGCTTTCGCTCGGCGTAGA
GCGAGCCACGAGTGTCTTGAAGTATTCAGAGCAGGACTA
CTTGATTACCGCTTCTTCCACCATCACAGAAGCGACTCCGCA
ATTTCAAGAAGTCATTGTCATCCCACCAGATGCACTTCCACC
CCTAGGAGACGTCTATCCTGGCAACCGTACGTACGCCAGGAA
GGTGCCTGAATTTGGATGCATGCTGCAATGATCAACCCCGCA
CGTCTTTTCCCCCTTATTATTCTGTGCTGCAATATCCCACTCCTC
GATCCACGCCACGCGCCGATGCTCATGCTCACTTCTCAGCC
TCTACCTGACCTCCCAAGCTTCAAAGTATATTTTTCGGGAATCC
CTGTGAGATTGAGTTGAAAATGCGGCCCTATCACTGTGGA
CGACCGGCGGTTGCAGGGCCTTACATGTACACGATGAGGAT
ATGGCGTAATATACGAAACAGAGCTTTTGTATGTCCACGGGAC
GAAATGCTCTACTTCTTCCACCCCTCCGTGGAGATGAGGTAG
TAAAAAAGGAAAATCCGACATTGTTACCCGATATTTGAGGTGCA
ATCTCCTGGGACTCGATCGCACTTGCAGCACAGCACTACGCA
GTCCCAATGAAGTTCGGGTGAGTGAAGATGTCGCATTGGAC
ATCGAAGATGCGGTCATTCAAGACCGCTGGGCACAGTTTACCA
GACGATATGATGTTGTCAGATTGCGACCAGATCTGAACCCACT
TAGTCCGCCTTTTGGAGACAGAACCTGGAAACCCGAAATACAAA
ACTCTCGTCGATTTTTGCAAAGCCCATAGAAAGGATTTTAAAG
GATTGAACGACTACAATCAAGTTCTCGTTCAAGTTTCCAGATT
CCTGTTTTCTGGATCGTTTGAATCCCAGTACTCCTGCTGGCA
CGGAGCACGGCGATTCTGTCGTTGATACTTCATACCGGAGCT
GTGCGCGAAATGTACAATACCTGCAAGTACTATGCGCACTGCG
CTCCTATTCCCTTGTATTCTGCAGAGGATCGACGAGTTCTGCT
TAATCAAGGAATTAATGTTAGATTATTCAACAGCGTCATACCG
GATACACTTTTGCACGTAGCCCTTACTACGCGTTCCGCCGGAT
TGGAGTACGACTATGAACGCTTGGAGATGCTAGGGGACGCTT
TTCTCAAATACCTCGCTTCCCTCCACGTCTTTGTCTCGGAGCC
GCATCGAGATGAAGGATATATGCATGTTGCAAGGCAGAAAGCTT
GTTAGTAACAAGACCCTGCTGGAATGCGCGCTCTCTGTCGGC
CTTCCATCATACATTCAGTCAAGACCCTTTAGCCGTGAGAAATTG
GCAGCCACCAAACCTTTCATGTAGAAGCTGACGTTCCGAGTATC
AGCCCCGAACTTGTCCGGCTCGAACCGTGTCAAGCGCTGAT
ACCGAAAGAGCTGGCTCAGTTGCTACATCAGTCATTCCAAGCC
CCGATGGTGATACACCGATTACCGGATACACCGATGCTGTACC

```

CTCAGAAATTC AAGATCCTAATCCGACGAAGAAAAAAGGAAA
TCAAAGAAGAAGAAAGTTGTGGGCGAACAGCTAGTTACCTACC
TTGGAGATAAAGCCGTCGCGGATGTTGTGGAAGCCATCATTG
GAGCTGCGTTTTGTCAGCGGAGGCAGCGATCCCGCGTTGCGAG
CTGCGAAATCCCTGAACTTACCCATCATGTCCGAGATCGAAGA
ATGGTCAGACTTTTCGCCGTCTAGCAGAGACGATATCTTGGCAT
ACTCCCGCGGGAACGAGGAAAGTGCCCGTCGAGAAAGTTGAA
CAGATCATCGGTCATCGATTCAAACGGCCGCACCTACTGGGTC
AAGCCTTGACACATCTCTCAAAGGCACACCCTGAATCTACGTC
TTACAGCAAACCTCGAATTCATCGGAGATGCTATTTTGGACTTCA
TGGTTCGTGCGACATGTTTTTGTATCGTAACCAACAGTTGGCACC
AGGTGCTCTGACTTTACTAAAGGGCGCTATGGTCAGCAATTCT
GCTCTCGCAGCTGTCAGCGTCTCTTCAGGTTTACATCAATACC
TATTACTCGAATCAGCTCAGCTGGAGGGCAATATAACAATCTTA
CATCACAACCATTCAACAAAAGGAGTCCGAGGAGCGCGCAAAT
GCCATCAAGGAGCACAGGCTTGTGGACAGTATTGGCATTGATA
TTGAAGCTCAAAGGTACTAGCGGATATTGTGGAGGCCATTAT
CGGTGCAGTTTACATCTCGGACGATTTCTGTCCGATTGGCGCT
GAGAAACTTTTTGAGCGCGTGTGAAGCCATTCTACGACGAGC
ACATTAGTCTTCAAACCTTTGGCACACCATCCGACCAAGTTGCTT
CTTGAATTGTTCCAGAGTAAAGGATGCCACCAATTTGAAATTGT
CAGGGAAGAAGAACAGTGTTCATGTCTTGGTACACGATGTCATT
CTTGCTAGTGACATGATTCCAACGCCGCTGCCGCTGCGAGA
CTGGCCTCTGTACTCGTTTTGGATGCCCTGGAAGGGGATCCT
GGGTTCTTAAGGCGGACTTGCAACTGCTGGGCACAAAGAAATA
CGAAAGCAGGGGAGAAGAGAGTTTTTGACGGGTTTCAAGGAGG
GTGAATTTGAACTTGATTAG

```

Para a clonagem das *Dicers*, foi empregada a reação de adição de cauda poli-A composta por 5 μL do produto de PCR purificado, 0,5 μL dATP (10 mM), 0,5 μL tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 μL MgCl_2 , e 1 μL *Taq* polimerase. A reação foi mantida a 72°C por 30 min. O produto da reação foi ligado em vetor de entrada usando o kit *pCR8/GW/TOPO* (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), conforme instruções do fabricante. Um volume de 0,8 μL da reação de ligação foi utilizada na transformação de bactérias eletrocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH5 α , utilizando cubetas de 1 cm de abertura de arco e equipamento eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA, EUA). Após eletroporação, as células eletrocompetentes foram mantidas em meio SOC (20 g L⁻¹ de triptona, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g L⁻¹ de NaCl, 180 μL de 20% glicose, pH 7,0) sob agitação a 120 rpm por 1 h. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (10 g L⁻¹ de bacto-triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de NaCl, 15 g L⁻¹ ágar, pH 7,0) acrescido de 100 mg L⁻¹ de espectinomicina e foram mantidas a 37°C por 16 h. Após o aparecimento de colônias, foi realizado a coleta de 12 colônias de *E. coli* e seu cultivo em 5 mL de LB líquido acrescido de 100 mg L⁻¹ de espectinomicina sob agitação a 120 rpm e 37°C por 16 h. Após o período, estoques individuais de cada uma das 12 amostras foram preparados com 1:1 (v/v) de solução bacteriana e glicerol

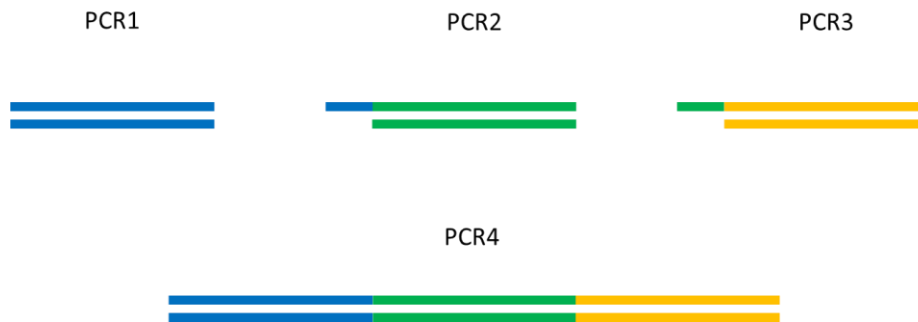
50% estéril e foram armazenados em ultrafreezer (-80°C). O restante da solução bacteriana foi utilizado na extração de plasmídeos por lise alcalina. Seguindo o protocolo de Birnboim; Doly (1979), o DNA plasmidial resultante da extração foi ressuspensionado em 20 µL de solução de TE acrescido de RNase A (50 µg mL⁻¹) e quantificado em fluorômetro *Hoefler DyNA Quant 200*. As amostras de DNA plasmidial foram validadas para presença dos fragmentos por digestão enzimática, numa reação composta por 1X tampão *EcoRI*, 0,5 U *EcoRI* e 1000 ng de DNA plasmidial, e sequenciamento empregando os *primers* utilizados na clonagem dos fragmentos e *primers* específicos do vetor pCR8 (GW1 For – GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC; e GW2 Rev – GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA) com sequenciador *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA) do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP).

Após a validação da fidelidade das sequências de *Dicers* clonadas em pCR8, uma das amostras de DNA plasmidial de cada construção foi selecionada para as reações de recombinação dos três fragmentos por meio de *primers* específicos contendo bordas coesivas com fragmentos de *Dicer* adjacente (Tabela 2). Para este procedimento foram montadas quatro reações de PCR (Figura 7). A primeira reação consistiu na amplificação do fragmento *MpDCL-1*. A segunda reação consistiu na amplificação do fragmento *MpDCL-2* contendo borda coesiva para ligação em *MpDCL-1*. A terceira reação consistiu na amplificação do fragmento *MpDCL-3* com borda coesiva para ligação ao fragmento *MpDCL-2*. Numa última reação, composta por 1X tampão PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 U de HiFi *Hot Start High Fidelity Taq* polimerase, 0,4 µM de cada *primer* e 10 ng de cada produto de PCR obtido anteriormente, foi obtido o fragmento *MpDCL-1/2/3*. Em todas as reações foi empregado o kit de PCR de alta fidelidade Kapa Biosystems. Foram utilizadas temperaturas de anelamento de *primers* e tempo de extensão de 47°C e 30 s, 49°C e 30 s, 50°C e 30 s, e 49°C e 1 min, respectivamente em cada PCR. Todos os produtos de PCR foram visualizados em gel de 2% agarose e tampão TAE em exposição à luz UV. Os fragmentos foram recortados do gel com bisturi e conduzidos à purificação com o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*. Os fragmentos de DNA purificados foram quantificados em fluorômetro *Hoefler DyNA Quant 200*.

Tabela 2. *Primers* utilizados na união dos fragmentos de *Dicers* de *M. pernicioso*. Em negrito, estão representadas as bordas coesivas adicionadas aos fragmentos de DNA

Primer	Sequência	Amplicon
MpDCL-1 For	TCAGTCAAGACCCTTTAGCC	237 pb
MpDCL-1 Rer	TTTTTCTTCGTCGGATTAGG	
MpDCL-1/2 For	CGAAGAAAAA CTTCGCACTT	261 pb
MpDCL-2 Rer	CACCTCTCGCTCCATATTCT	
MpDCL-2/3 For	GCGAGAGGTG ATAGCGTTC	264 pb
MpDCL-3 Rer	TCAGTCAAGACCCTTTAGCC	

Figura 7. Representação esquemática da união dos fragmentos das três *Dicers* de *M. pernicioso* por técnica de PCR



3.3.3. Clonagem do fragmento MpDCL-1/2/3

Para a clonagem do fragmento *MpDCL-1/2/3*, foram empregados os mesmos procedimentos anteriores de adição de cauda poli-A e ligação em vetor de entrada pCR8. O produto da ligação foi transformado em bactérias eletrocompetentes de *E. coli* cepa DH5 α conforme já mencionado anteriormente. Células transformadas foram crescidas em meio LB sólido acrescido de 100 mg L⁻¹ de espectinomicina e mantidas a 37°C por 16 h. Após o aparecimento de colônias, foi realizado a coleta de 12 colônias de *E. coli* e seu cultivo em 5 mL de LB líquido (sem ágar) acrescido de 100 mg L⁻¹ de espectinomicina sob agitação a 120 rpm e 37°C por 16 h. Após o período, a solução bacteriana foi conduzida à extração de plasmídeos por lise alcalina. Segundo protocolo de Biomboim; Doly (1979), o DNA plasmidial resultante da extração foi ressuspendido em 20 μ L de solução de TE acrescido de RNase A (50 μ g mL⁻¹) e quantificado em fluorômetro *Hoefler DyNA Quant 200*. As amostras de DNA plasmidial foram validadas para presença dos fragmentos por digestão

enzimática, numa reação composta por 1X tampão *EcoRI*, 0,5 U *EcoRI* e 1000 ng de DNA plasmidial, e sequenciamento de DNA com os primers utilizados na clonagem dos fragmentos e *primers* específicos do vetor pCR8 (GW1 For e GW2 Rev).

3.3.4. Recombinação do fragmento MpDCL-1/2/3 em vetor de silenciamento

A partir da validação da fidelidade da sequência *MpDCL-1/2/3* clonadas em pCR8, este fragmento foi recombinado em vetor de silenciamento pK7GWIWG(II) (Karimi et al., 2002) por meio do kit *LR Gateway Clonase Plus II* (Life Technologies; Carlsbad, CA), gerando a construção pK7GWIWG(II)::*MpDCL-1/2/3*. Um volume de 0,8 µL do produto da recombinação foi eletroporado em *E. coli* cepa DH5α, conforme já mencionado. Células transformadas foram selecionadas com base em antibióticos espectinomicina (100 mg L⁻¹) e canamicina (10 mg L⁻¹) em meio LB sólido. Após o crescimento de colônias, foram preparadas 10 amostras de solução bacteriana para preparação de estoque com glicerol 50% e posterior extração de DNA plasmidial por lise alcalina. As amostras de DNA plasmidial de *MpDCL-1/2/3* em pK7GWIWG(II) foram confirmadas e validadas com digestão enzimática com enzima *BamHI*, e sequenciamento com *primer* 35S For (CTATCCTTCGCAAGACCCTTC).

3.3.5. Transformação genética de tomateiro via *Agrobacterium tumefaciens*

3.3.5.1. Material vegetal

Para os ensaios de transformação genética de tomateiro empregando a construção *MpDCL-1/2/3* foi empregado o genótipo Micro-Tom (MT).

3.3.5.2. Plasmídeos e condições de cultura de *A. tumefaciens*

Foi seguido o protocolo de Pino et al. (2010). Colônias de *Agrobacterium* EHA105 (*MpDCL-1/2/3*), crescidas por dois dias em placas foram inoculadas em 50 mL do meio LB suplementado com espectinomicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (100 mg L⁻¹), e crescidas sob agitação constante de 120 rpm a 28°C *overnight*. Após esse período, a suspensão foi colocada num tubo estéril e foi sedimentada a 1.900 rpm a 20°C por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a

Agrobacterium ressuspendida em meio MS líquido, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e a OD_{600nm} foi ajustada para 0,2-0,3; 10 min antes do co-cultivo, 100 µM de acetosiringona foi adicionado à suspensão de *Agrobacterium*.

3.3.5.3. Inoculação e co-cultura

Explantos cotiledonares foram retirados de plântulas crescidas *in vitro* com 8 dias de idade e colocados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com vitaminas B5; sacarose (30 g L⁻¹); 0,4 µM de ANA; 100 µM de acetosiringona. Uma ou duas gotas da suspensão bacteriana foram aplicadas sobre os explantes. Após 10 min, a suspensão foi removida, e para a retirada do excesso de *Agrobacterium*, duas folhas de papel filtro estéril foram colocadas sobre os explantes. O co-cultivo foi conduzido em meio MS sólido suplementado com vitaminas B5; sacarose (30 g L⁻¹); 0,4 µM de ANA; 100 µM de acetosiringona por 2 dias no escuro a 25°C.

3.3.5.4. Seleção e obtenção das plantas transformadas

Após esse período, os explantes foram transferidos para meio MS suplementado com vitaminas B5; sacarose (30 g L⁻¹); 5 µM de BAP e antibióticos (25 mg L⁻¹ meropenem, para controle da *Agrobacterium*, e 100 mg L⁻¹ de kanamicina, para seleção das plantas) e foram mantidos em sala de luz sob fotoperíodo de 16 h a 25°C. A cada duas semanas, os explantes foram transferidos para meio de regeneração novo, suplementado com antibióticos. Quando as gemas adventícias formadas nos explantes estavam com tamanho maior que 5 mm, elas foram isoladas e transferidas para frascos contendo meio MS suplementado com os mesmos antibióticos. Os brotos foram mantidos *in vitro* até a formação de raízes e foram posteriormente aclimatizados.

3.3.5.5. Confirmação da transformação das plantas de MT

Utilizou-se o método de Doyle; Doyle (1987). Duas amostras de folhas de cada planta foram retiradas para extração do DNA. As folhas foram maceradas em moinho criogênico, o volume de 650 µL de tampão CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM

Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1% PVP) acrescido 0,1% de β -mercaptoetanol e 0,01% de proteinase K adicionados ao tecido macerado e aquecido a 65 °C por 30 min. Em seguida, foi adicionado 300 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e 300 μ L de fenol equilibrado e centrifugado a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido e a etapa anterior foi repetida. O sobrenadante foi transferido novamente, adicionado 60 μ L de 3M acetato de sódio e 1,2 mL de 95% etanol. Incubou-se as amostras por 30 min e centrifugadas a 1.000 g por 5 min. Após isso, o remanescente foi descartado e o pellet lavado com 70% etanol. O material resultante (*pellet*) foi ressuscitado em TE+RNAse (10 μ g mL⁻¹). A quantificação do DNA foi realizada em fluorômetro Qubit (ThermoFisher Scientific).

Para a amplificação, utilizou-se 15,4 ml de H₂O mQ, 2,5 μ L de tampão KCl (10X), 2,5 μ L de MgCl₂ 25 mM, 1 μ L de mix dNTP 10 mM, 1 μ L do primer 01 (35S Forward [CTATCCTTCGCAAGACCCTTC]) a 10 μ M, 1 μ L do primer 02 (DCL-3 Reverse [CTTGAGAGGCACCTTGAAAT]), 0,6 μ L da *Taq* DNA Polimerase 5 U/ μ L, 1 μ L de DNA a 25 ng/L. A ciclagem de PCR foi realizada com denaturação inicial de 3 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 50°C por 30 s e 72°C por 1 min, e extensão final de 3 min a 72°C. O produto de PCR foi visualizado em gel de 2% agarose e tampão TAE em exposição à luz UV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

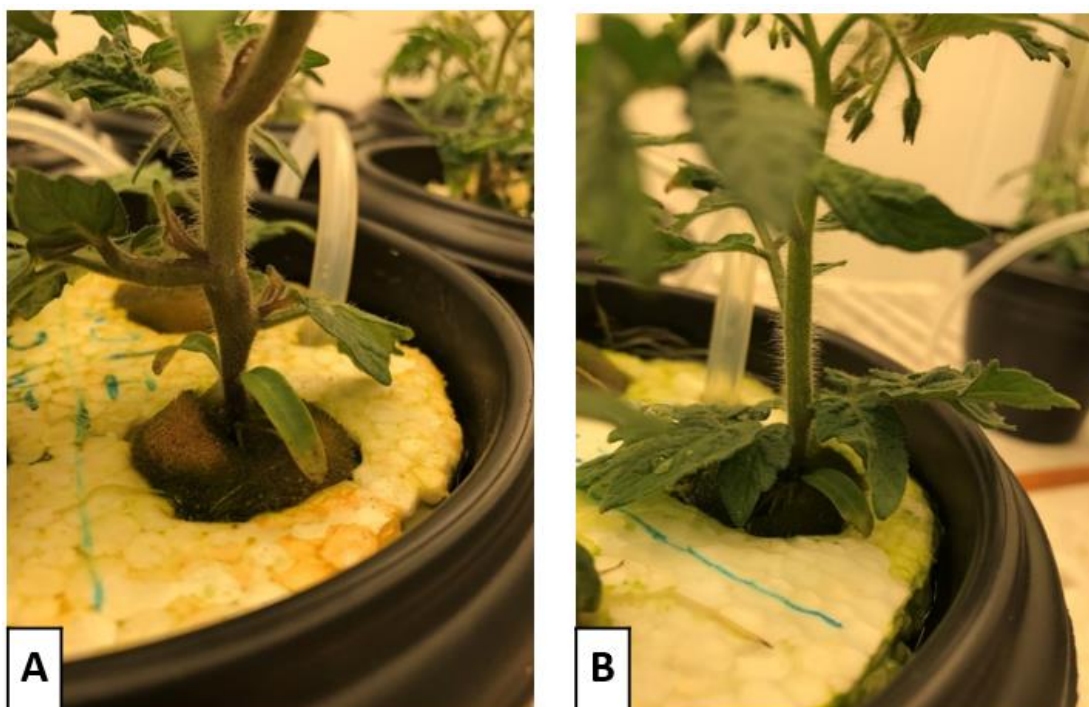
4.1. Ensaio com inibidores da AOX

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento de plantas de tomateiro “Micro-Tom” com o inibidor da AOX ‘7j-41’, foi realizado um ensaio com o fornecimento do composto em solução nutritiva para ser absorvido pelas raízes das plantas, que foram então inoculadas ou não com *M. perniciosa*. O primeiro desafio foi identificar e estabelecer adjuvantes químicos que permitiriam a solubilização do ‘7j-41’ em meio aquoso. Em ensaios preliminares, foram testados seis adjuvantes (descritos no Material e Métodos) sob diversas concentrações crescentes de forma a solubilizar o ‘7j-41’ e não causar efeitos tóxicos às plantas. O composto nonil fenoxi poli etilenoxi etanol (Agral) demonstrou a melhor eficiência na concentração de 0,02%, sem induzir efeitos fitotóxicos visuais.

A seguir, foi conduzido um experimento empregando o mesmo adjuvante (Nonil fenoxi poli etilenoxi etanol) para solubilizar ‘7j-41’ que foi fornecido sete dias após o transplante das mudas para solução nutritiva. As plantas foram mantidas em contato com o ‘7j-41’ adicionado ao adjuvante e então foram inoculadas dois dias depois.

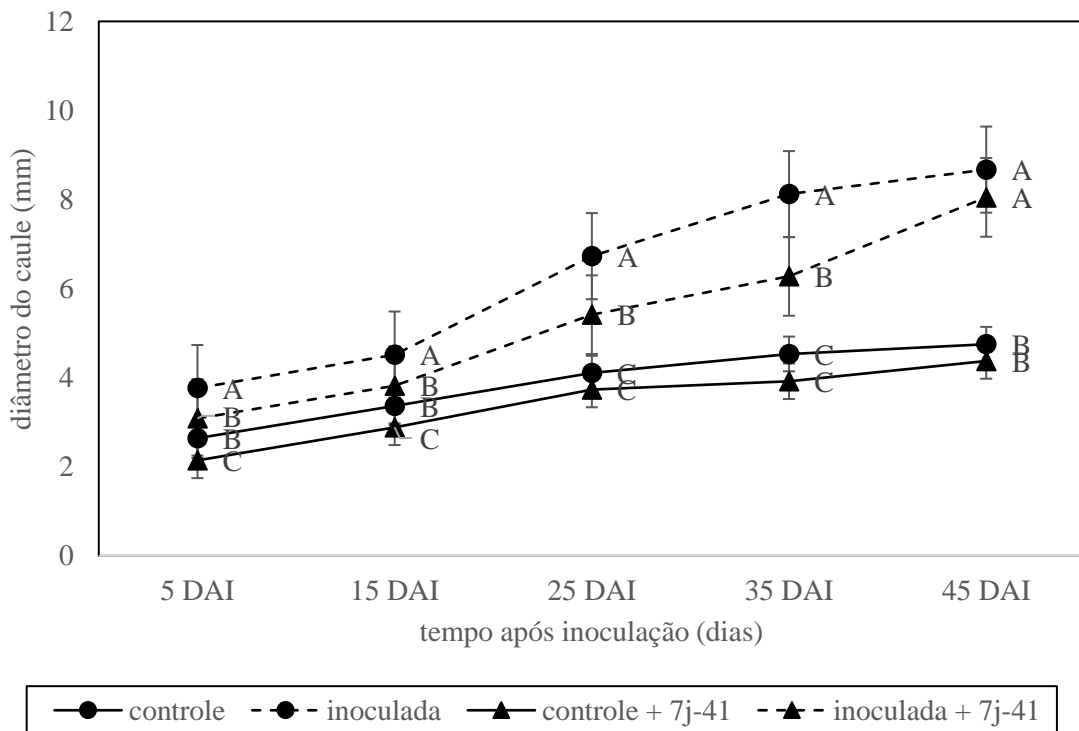
A inoculação de plantas de MT com *M. perniciosa* causou uma alta taxa de infecção (94%) e sintomas bastante visíveis a partir de 25 dias após a inoculação (DAI), principalmente inchamento do caule (Figura 8A), comparado a planta não inoculada com caule de diâmetro normal (Figura 8B).

Figura 8. Sintoma típico da infecção de tomateiros 'Micro-Tom' por *M. perniciosa* avaliados 25 dias após a inoculação. A. Inoculado; B. Não-inoculado



O inibidor da AOX '7j-41' foi capaz de reduzir a severidade da infecção de *M. perniciosa* em plantas de MT nas avaliações de diâmetro em relação ao controle não tratado (Figura 9). Nas avaliações iniciais (5 a 35 DAI), observou-se redução significativa no inchamento do caule provocado pela infecção de *M. perniciosa* onde houve tratamento com '7j-41'. Aos 45 DAI, a diferença já não era significativa, indicando que o efeito residual do composto em retardar a infecção havia possivelmente se reduzido. Por outro lado, em plantas não inoculadas, a aplicação de '7j-41' reduziu significativamente o diâmetro das plantas tratadas em relação aos controles de 5 a 15 DAI, sugerindo a ocorrência de efeito fitotóxico do composto; essa redução não foi mais significativa de 25 a 45 DAI, sugerindo a redução do efeito residual do composto.

Figura 9. Avaliação do diâmetro (mm) de plantas de MT ao longo do tempo após a inoculação¹



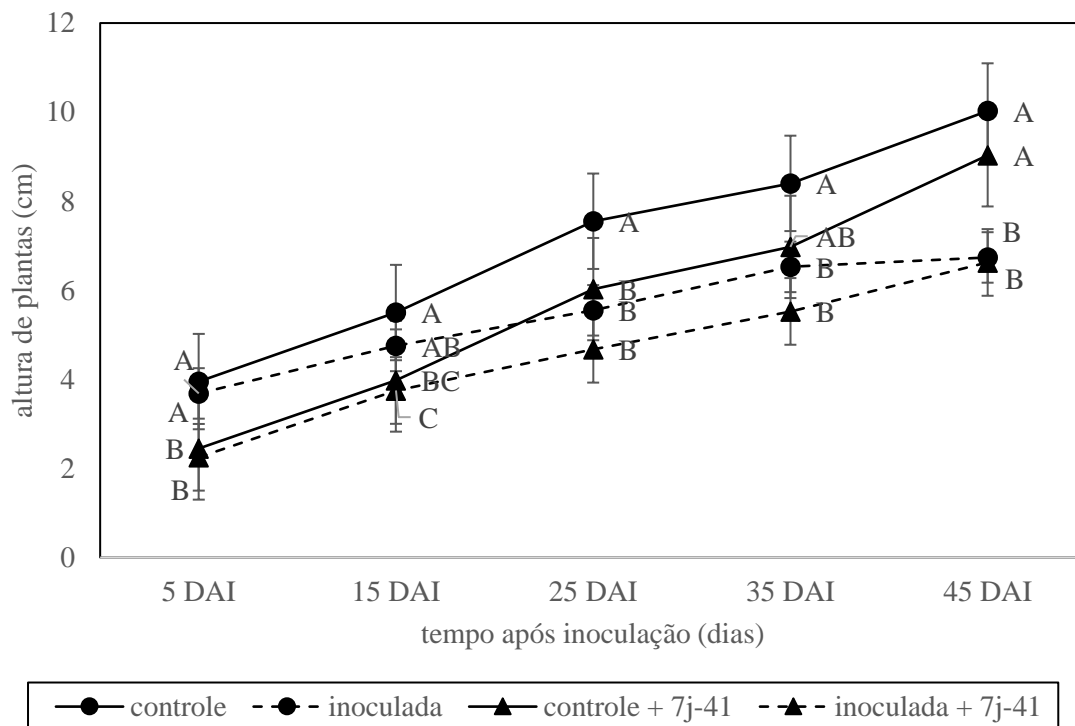
¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Em relação a altura média das plantas (Figura 10), o tratamento com '7j-41' causou redução significativa no porte das plantas tratadas, mostrando possível efeito fitotóxico. Da mesma forma, essa diferença na altura não foi significativa entre o tratado ou não com '7j-41', aos 35 e 45 DAI (Figura 10). A inoculação com *M. perniciosa* também retardou significativamente o crescimento nos controles e tratados com '7j-41' a partir de 25 DAI. Aos 45 DAI, só se observa efeito da inoculação e não mais do tratamento com '7j-41', o que evidencia que o efeito do '7j-41' foi atenuado, ao passo que a infecção pelo fungo se acentuou ao longo do tempo (Figura 10).

Deganello et al. (2014) estudando a interação da infecção de tomateiro MT pelos biótipos C (que infecta *Malvaceae* como *T. cacao*) e biótipo S (que infecta *Solanaceae*, como tomateiro) de *M. perniciosa*, observou que, como esperado, a inoculação pelo biótipo-C não promoveu sintomas nem danos visuais aparentes às plantas de tomateiro, exceto por contrastante redução em altura e concluíram se tratar tipicamente de interação com organismo não-hospedeiros, já que o mesmo não foi

observado diante da inoculação por microrganismo não patogênico (*Saccharomyces cerevisiae*). No caso da infecção por *M. perniciosus* biótipo-S, os efeitos da inoculação foram mais drásticos e sintomáticos da doença, assim como os apresentados neste trabalho, em que houve significativo aumento de diâmetro desde os 5 DAI e redução da altura de plantas a partir de 25 DAI.

Figura 10. Avaliação da altura (cm) de MT ao longo do tempo após a inoculação¹

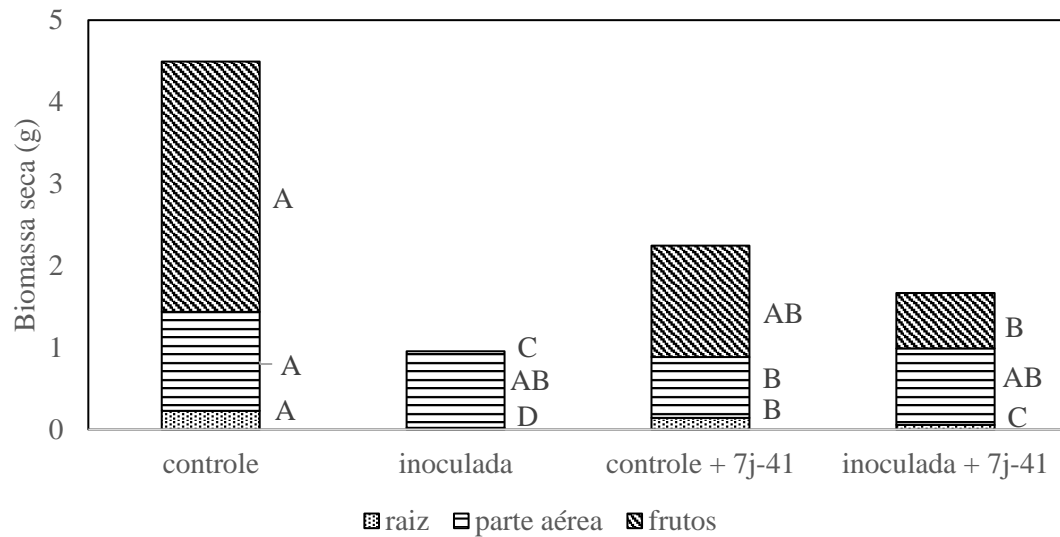


¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05)

O tratamento com '7j-41' surtiu efeitos positivos nos parâmetros de biomassa seca de raízes e de frutos (Figura 11) e contagem do número de frutos coletados aos 55 dias após a inoculação (Figura 12) ao reduzir o impacto negativo de *M. perniciosus* sobre as plantas de MT inoculadas. Plantas infectadas pelo fungo apresentam uma redução expressiva do acúmulo de biomassa, principalmente das raízes e frutos (Figura 11), neste último tanto na quantidade como no peso dos mesmos. Isto confirma suspeitas de outros autores de que, apesar de a infecção se iniciar nas regiões meristemáticas, o fungo coloniza regiões próximas ao ponto de inoculação e deprime seu desenvolvimento como um todo em diferentes órgãos (Teixeira et al., 2014; Paschoal, 2018).

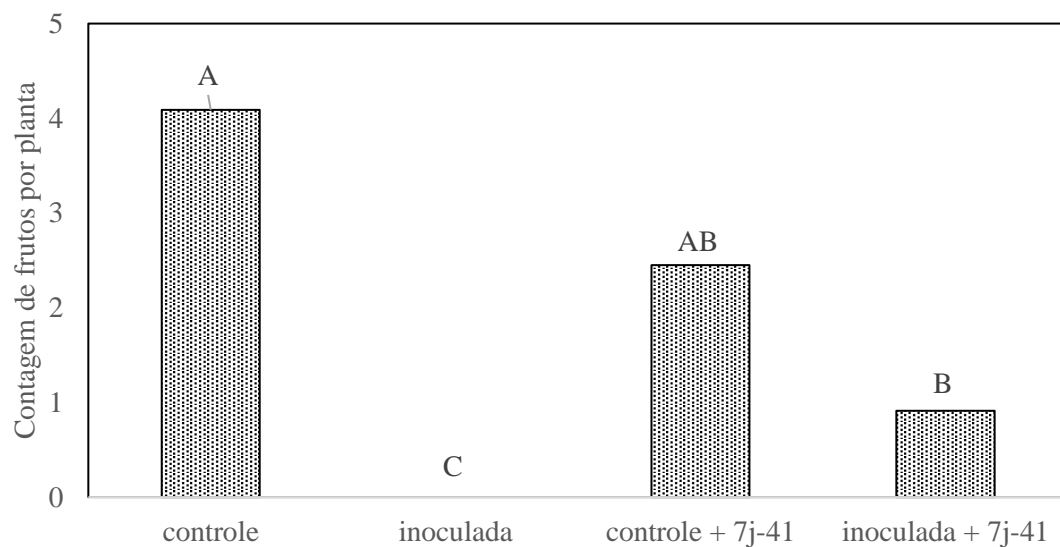
Apesar do efeito positivo, ao comparar plantas controle tratadas ou não com '7j-41', fica evidente também a redução do acúmulo de biomassa de parte aérea e raízes e número de frutos onde se usou o '7j-41', o que mais uma vez evidencia a possível fitointoxicação causada pelo composto.

Figura 11. Avaliação de biomassa seca (g) por parte da planta de MT aos 55 DAI¹



¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

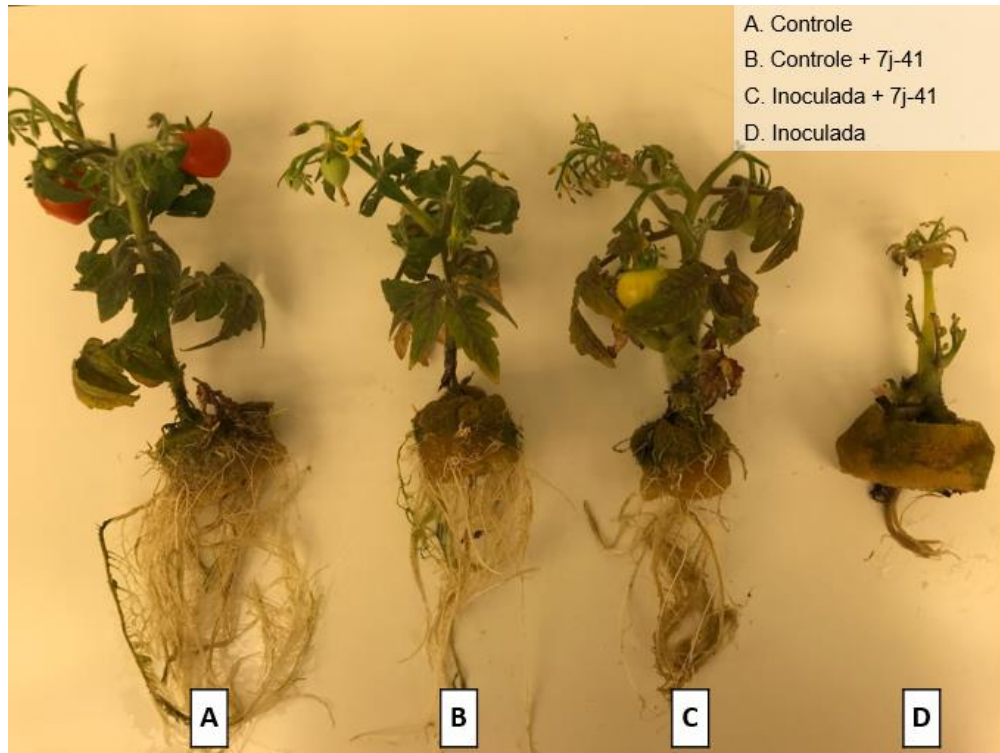
Figura 12. Avaliação de contagem de frutos por planta de MT aos 55 DAI¹



¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A seguir é apresentada uma foto de plantas de MT dos quatro tratamentos (controle, controle + 7j-41, inoculada +7j-41 e inoculada) aos 35 DAI (Figura 13).

Figura 13. Visão geral das plantas de MT (esquerda para direita) aos 35 DAI: A. Controle não-inoculada, B. Controle + '7j-41', C. Inoculada + '7j-41' e D. Inoculada



A partir dos resultados de Thomazella et al. (2012), observou-se que a AOX se expressa predominantemente na fase biotrófica do fungo e, quando se associa inibidores da AOX (SHAM ou n-propil galato) a inibidores da cadeia principal respiratória (no caso a estrobirulina azoxistrobina), obtém-se a uma letalidade sinérgica dos micélios biotróficos e necrotróficos de *M. perniciosa in vitro*. Posteriormente, Barsottini et al. (2019) estudaram a seleção e otimização de novos inibidores da AOX a partir de derivados da n-fenil benzamida e dados de respiração celular e crescimento da levedura *Pichia pastoris in vitro*, o que culminou na escolha de um composto com maior atividade, denominado '7j-41', que foi validado em testes *in vitro*, assim como *in planta* no patossistema *M. perniciosa X* tomateiro MT. A adição de '7j-41' aos esporos do fungo no momento da inoculação de MT promoveu a redução significativa na severidade da doença.

No trabalho aqui apresentado, observou-se significativa redução da severidade e aumento da produção de biomassa de raízes e frutos em plantas inoculadas e tratadas com '7j-41' quando comparadas a plantas somente inoculadas. Ainda assim, numa análise mais detalhada, nota-se que o nível de eficácia relativa de '7j-41' (severidade no controle subtraída da severidade do tratamento, dividida pela severidade da doença no controle) variou conforme segue: 5 DAI – 41%; 15 DAI – 40%; 25 DAI – 61%; 35 DAI – 63%; 45 DAI – 49%. Tais níveis de eficácia são considerados intermediários. As diretrizes para produtos de proteção de plantas consideram adequado valores a partir de 80% (EMPPPO, 2007).

Considerando que o ensaio foi conduzido em condições controladas, pondera-se que há espaço para melhorias e otimização da eficácia do '7j-41', tanto intrinsecamente, no desenho de novas moléculas de maior atividade ou a partir de um entendimento mais profundo de como ela atua, vias e tempo de degradação na planta, em quais tecidos se acumula, como forma de aplicação, formulação, associação a outros fungicidas e técnicas de controle.

Baseado nos resultados obtidos *in vitro* em micélio biotrófico e necrotrófico de *M. perniciosa* (Thomazella et al., 2012), espera-se que a adição de um inibidor da cadeia principal (como estrobirulinas) possa surtir resultados também em ensaios *in planta*. Há uma série de opções e alternativas de estrobirulinas, bem como outros fungicidas, por exemplo carboxamidas ou SDHI (*succinate dehydrogenase inhibitor*). Apesar da descoberta não tão recente deste grupo de composto, novos SDHIs têm sido desenvolvidos recentemente e são considerados potentes inibidores da respiração celular no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, o que os torna potencialmente sinérgicos a outros inibidores da respiração, como '7j-41', além de altamente eficientes em outros patossistemas (Sierotzki; Scalliet, 2013).

No ensaio de Barsottini et al. (2019) com plantas de tomateiro em que se adicionou o inibidor da AOX '7j-41' a esporos de *M. perniciosa* e aplicou-os às folhas, o nível de eficácia em todas as avaliações foi próximo de 100% (inibição total dos sintomas da doença). Isto demonstra que '7j-41' perde considerável atividade quando fornecido pelas raízes (eficácia ao redor de 50%). Pelas informações atualmente disponíveis, este fato pode ser explicado pelas características físico-químicas do composto: baixa solubilidade e provável baixa mobilidade nas plantas pelo modelo de Bromilow et al. (1990), resultando em baixas concentrações translocadas das raízes até o ponto de infecção na inoculação no meristema apical das plantas e

consequentemente menor efeito biológico sobre os esporos e hifas que iniciam a colonização no apoplasto da planta. Outra possível explicação é que '7j-41' tenha maior ação sobre esporos (como apresentado por Barsottini et al., 2019) do que sobre hifas que penetram os tecidos vegetais (neste ensaio). Estas hipóteses podem ser melhor entendidas a partir do conhecimento da mobilidade deste composto em tecidos vegetais, por exemplo, por meio de estudos com radiomarcagem, biocinética ou outras técnicas. Esta informação ajudaria a entender em qual o estágio de interação planta-patógeno '7j-41' é mais ativo (se aplicado de forma preventiva, curativa ou anti-esporulante).

Outro ponto observado nos resultados e carece de maior entendimento é a fitointoxicação visual evidente promovida por '7j-41', gerando necrose de folhas e atraso no desenvolvimento (Figura 13). A AOX é uma enzima funcional em plantas e o uso de um inibidor desta enzima pode ter causado a inativação da sua função. Sabe-se que em condições de alta luminosidade e em situações potencialmente geradoras de estresse oxidativo, a via respiratória dependente da AOX é superregulada e contribui para fotoproteção em plantas C3, como é o caso das plantas de tomateiro usadas neste ensaio (Zhang et al., 2017; Selinski, 2018). Interessante ponderar que este efeito não foi observado no ensaio de Barsottini et al. (2019) quando o mesmo composto '7j-41' foi aplicado às folhas, podendo ser órgão-dependente. Outra hipótese é que este efeito fitotóxico tenha sido exacerbado pelo sistema de condução em solução nutritiva, que favoreceu o contato direto e prolongado de '7j-41' em níveis que se mostraram fitotóxicos para as plantas de MT.

Diante das dificuldades relatadas na solubilização do '7j-41' em meio aquoso, uma importante demanda tanto do ponto de vista experimental, como do ponto de vista de desenvolvimento, seria o aprofundamento no conhecimento de tecnologias de formulação capazes de melhorar sua compatibilidade físico-química e performance biológica. Há raros relatos de agroquímicos compostos somente do ingrediente ativo. A partir do momento em que estes protótipos como o '7j-41', deixam de ser avaliados somente *in vitro* e avançam para estudos *in planta*, é necessário se pensar em como melhorar sua biodisponibilidade ao alvo (no caso o fungo *M. perniciosa*) e reduzir seus eventuais efeitos fitotóxicos que podem ser impeditivos do ponto de vista de avanço comercial no seu uso. Adjuvantes, surfactantes e outros agentes inertes do ponto de vista biológico podem ser adicionados à formulação desde que atendam aos critérios de performance biológica, compatibilidade com a planta (ausência de fitointoxicação),

custo, estabilidade e “formulabilidade”. Sabe-se por exemplo, que formulações do tipo EC (concentrado emulsionável) ou OD (dispersão em óleo) são adequadas para compatibilizar ingredientes ativos insolúveis em água e devem ser consideradas em próximas discussões (Knowles, 1998; Mulqueen, 2003; Baur; Aponte, 2014).

Os resultados expostos neste trabalho associados aos anteriores (Thomazella et al., 2014; Barsottini et al., 2019) mostram que os inibidores da enzima oxidase alternativa se apresentam como uma classe de compostos antifúngicos com potencial de serem usados no controle de *M. pernicioso*, e também em outros patossistemas. Neste trabalho, avançou-se mais um passo na avaliação *in planta* dos efeitos do inibidor da AOX ‘7j-41’ ao concluir que, quando administrado às raízes de tomateiro previamente à inoculação por *M. pernicioso* resultou na redução da severidade dos sintomas, bem como na preservação da biomassa de raízes e frutos dos efeitos danosos provocados pelo fungo.

4.2. Identificação de genes da rota de silenciamento gênico em *Moniliophthora pernicioso*

4.2.1. Busca dos genes

Os genes presumíveis participantes da rota de silenciamento gênico em *M. pernicioso* foram buscados com o intuito de identificar candidatos a serem empregados numa estratégia de RNAi HIGS, em que uma planta hospedeira expressando um dsRNA correspondente a genes alvos do fungo levará ao silenciamento destes genes. A hipótese a ser comprovada é que o fungo *M. pernicioso* utiliza pequenos RNAs para interagir com seus hospedeiros, desativando mecanismos de defesa da planta e promovendo virulência e o silenciamento de um ou mais genes essenciais deste mecanismo reduzirá a severidade da infecção.

Foram buscados os genes dos componentes principais da rota de processamento de pequenos RNA canônico descritos em fungos, definindo-se seis classes de genes: essenciais, composta por ‘RdRPs’, ‘*Dicers*’ e ‘Argonautas’; e não-essenciais na qual fazem parte as ‘RecQ helicases’, ‘RPA-1’ e ‘QIP’.

Na busca por palavra-chave (como “*Dicer*” ou “Argonauta”, por exemplo) no banco de dados genômicos e de expressão de *M. pernicioso* isolado BP10 (Teixeira et al., 2014 - disponível em WBD ATLAS <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>), foi

possível identificar oito RdRPs, três *Dicers*, 13 Argonautas, 17 RecQ helicases, cinco RPA-1 e uma QIP. Após realizar a análise de BLASTp usando como molde as sequências de proteínas descritas em *N. crassa* e retirando os genes com e-value menor do que 10^{-4} , este número passou para oito RdRP, quatro *Dicers*, 14 Argonautas, 28 RecQ helicases, cinco RPA-1 e duas QIPe, totalizando 61 genes (Tabela 3).

Tabela 3. Genes candidatos a participarem da rota de processamento canônico de pequenos RNAs de *M. pernicioso* após busca por palavra-chave e BLASTp, indicando a classe, número e identificação dos genes presumíveis em *Moniliophthora pernicioso*

Classe	Quantidade de genes	Identificação do gene
RdRP	8	MP02213, MP11137, MP02297, MP15899, MP09882, MP00604, MP10417, MP08656
<i>Dicer</i>	4	MP01869, MP14055, MP10442, MP02453
Argonauta	14	MP03238, MP03267, MP03288, MP07032, MP07178, MP07431, MP08202, MP08788, MP08974, MP13872, MP13876, MP13957, MP10832, MP12999
RecQ helicase	28	MP00763, MP01699, MP03701, MP04057, MP04710, MP06392, MP07550, MP11895, MP15420, MP09541, MP00762, MP14297, MP01830, MP12150, MP12680, MP00233, MP02642, MP04844, MP07090, MP12489, MP12680, MP13589, MP14167, MP14995, MP16430, MP16505, MP16519, MP16544
QIP	2	MP00590, MP03252
RPA-1	5	MP01410, MP02314, MP08906, MP10591, MP11091

Fonte: Teixeira et al. (2014) – disponível em WBD ATLAS Disponível em: <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>

A partir desta lista de 61 genes, dentro de cada grupo, foi analisada a sequência de aminoácidos por meio do alinhamento múltiplo global no *software* MAFFT (Kazutaka et al., 2017 - disponível em <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) e em seguida para estrutura e domínios proteicos conservados, pelo site do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Anexo I).

Dos 61 genes da busca por palavra-chave e BLASTp, 44 foram selecionados a partir do alinhamento múltiplo, que permitiu retirar proteínas preditas incompletas, e também aquelas com ausência de domínios proteicos tidos como essenciais para a funcionalidade dos genes da rota de processamento de pequenos RNA canônico, conforme descrito no item 2.4. As análises estão disponíveis nos Anexos D a J.

Sendo assim, os genes selecionados ao final estão discriminados na Tabela 4, e contam por um total de sete RdRP, três *Dicers*, dez Argonautas, 21 RecQ helicases, uma RPA-1 e uma QIP.

Tabela 4. Proposta de genes participantes da rota de processamento de pequenos RNA canônico de *Moniliophthora perniciosa* indicando a classe, número de genes identificados e a identificação dos genes presumíveis

Classe	Quantidade de genes	Identificação do gene
RdRP	7	MP02213, MP08656, MP15899, MP10417, MP09882, MP11137, MP02297
<i>Dicer</i>	3	MP14055, MP10442, MP01869
Argonauta	10	MP08788, MP10832, MP08974, MP08202, MP13872, MP13876, MP03288, MP07032, MP03267, MP03238
RecQ helicase	21	MP00763, MP14995, MP01699, MP07550, MP13589, MP09541, MP12489, MP06392, MP14167, MP16544, MP03701, MP16505, MP16430, MP04710, MP01830, MP12150, MP12680, MP00233, MP02642, MP04844, MP07090
QIP	1	MP00590
RPA-1	1	MP02314

Fonte: Teixeira et al., 2014 – disponível em WBD ATLAS Disponível em: <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>

Neste trabalho, os resultados apontam que *M. pernicioso* possui 3 *Dicers*, 10 Argonautas e 7 RdRPs. Sabe-se que os genes *Dicers* e Argonautas são atuantes exclusivos no processamento de pequenos RNAs e podem diferir consideravelmente quanto a ocorrência e arquitetura. Analisando 43 genomas de fungos, Hu et al. (2013) mostraram que o número de genes Argonautas variou de zero em *Ustilago maydis* e *Candida lusitanae* a nove em *Phlebia brevispora*, enquanto o número de *Dicers* variou de zero em *Candida albicans*, *C. lusitanae* e *U. maydis* até cinco em *Fomitopsis pinicola*. Nas espécies de zigomicetos *M. circinelloides* e *Rhizopus oryzae* foram encontradas duas cópias de Argonautas e duas de *Dicers*.

No filo Basidiomiceto, por sua vez, são encontrados em média dois genes *Dicers* e três Argonautas, e especificamente na Classe *Agaricomycetes* a variação é ainda maior: média de três e seis, para *Dicers* e Argonautas, respectivamente. Nos subfilos *Pucciniomycotina* e *Ustilaginomycotina* o número de cópias desses genes é reduzido ou até ausente. Isto caracteriza os Basidiomicetos como grupo com maior variação destes genes dentre os fungos. A Ordem *Agaricomycotas*, na qual está presente o fungo *M. pernicioso*, geralmente apresenta maior número de Argonautas e *Dicers* do que *Ascomycota* e *Zygomycota* (Hu et al., 2013).

Em relação as RdRPs, na maioria dos fungos, há três ou quatro genes, como em *Laccaria bicolor* e *Phycomyces blakesleeianus*, respectivamente. Em *S. pombe*, foi encontrado somente um gene codificador desta enzima (Zong et al., 2009).

Hu et al. (2013) descreveram a evolução das proteínas *Dicers* e Argonautas em fungos e, baseados na análise filogenética usando dois domínios RNase III presentes em todas as proteínas *Dicers*, dividiram-nas em três grupos: dcl-A, B e C. Segundo estes autores, o grupo dcl-C contém proteínas somente de espécies de Basidiomicetos, enquanto dcl-A e B são encontradas também em outros filós.

Pela busca por BLASTp, MP14055 foi classificada como uma *Dicer-like 1*, MP10442 como *Dicer-like 2* e MP01869 classificada somente como *Dicer-like*. Não foram descritos homólogos do gene MP01869 em *N. crassa* nem em outros organismos.

A filogenia dos subgrupos de dcl-B e dcl-C segue a diversificação taxonômica de Ascomicetos e Basidiomicetos. A arquitetura dos domínios de Dcl-b e c são integrais e conservadas, ao passo que em Dcl-a alguns domínios podem não estar presentes. Apesar da estrutura diversa, há evidências de que dcl-a é essencial para a produção de pequenos RNAs não codificantes em outros organismos (MacRae et al.,

2007, Wang et al., 2010). Desta forma, hipotetiza-se que MP01869 (aqui denominada de “*Dicer-3*”) seja o equivalente ao que Hu et al. (2013) chamaram de dcl-C, por estar presente no basidiomiceto *M. pernicioso* e não ter sido encontrada nenhuma semelhante no genoma de referência do ascomiceto *N. crassa*.

Para Argonautas, Hu et al. (2013) comentam que proteínas podem ser divididas em pelo menos dois grupos: ago-A e ago-B. Ascomicetos e Basidiomicetos possuem ago-A, enquanto ago-B está presente somente em Basidiomicetos. No caso de *M. pernicioso*, as 10 Argonautas podem fazer parte de ambos os grupos, o que não foi possível distinguir pelas análises conduzidas neste trabalho.

A quantidade de genes relacionadas ao processamento de pequenos RNAs em *M. pernicioso* é extensa em comparação a outros fungos. Pondera-se, no entanto, que alguns desses genes tem outras funções que não necessariamente relacionadas ao processamento de pequenos RNAs. Por exemplo, RecQ helicases apresenta importantíssima função na ligação da replicação, recombinação e reparo de DNA (Benett; Keck, 2004) e RdRPs que catalisam a replicação do RNA a partir de um molde de RNA (Zong et al., 2009).

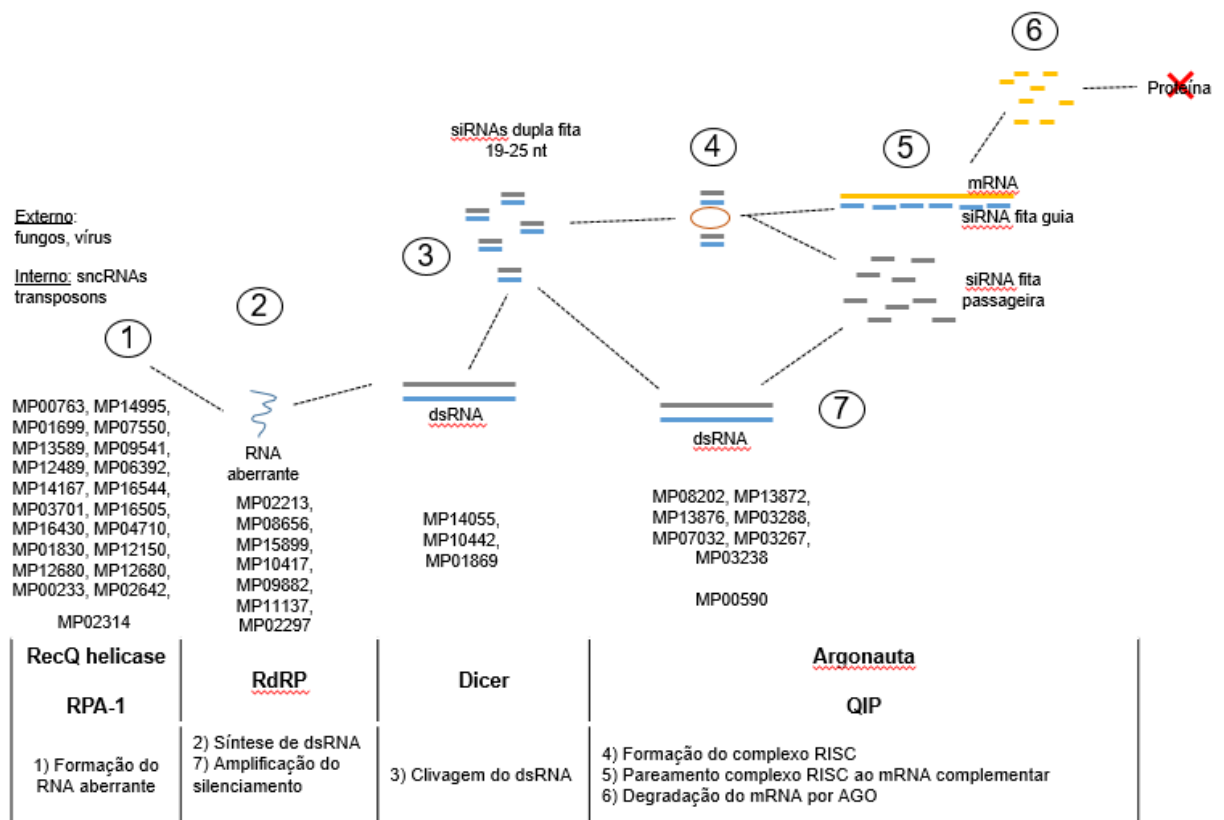
Outro fator a se ponderar é o fato de, apesar de estarem no genoma de *M. pernicioso*, estes genes podem não estar sendo expressos e, portanto, não terem atividade relevante na formação das proteínas funcionais que atuam no silenciamento gênico canônico descrito em fungos.

A grande quantidade de genes (3 *Dicers*, 10 Argonautas e 7 RdRPs) encontradas em *M. pernicioso* pode ser explicada como mecanismo evolutivo, biológico e adaptativo dadas as particularidades deste patógeno, o ambiente tropical de maior biodiversidade e exposto a uma série de competidores e condições competitivas com outros microrganismos e sua intrínseca interação com o hospedeiro *T. cacao*, possivelmente evoluindo de uma relação endofítica simbiótica benéfica, como observado em outras espécies do gênero *Crinipellis* a que *M. pernicioso* pertencia (Evans, 2016), e que, com a evolução levou a uma interação patogênica e que poderá ser melhor investigado em futuros trabalhos.

Diante disso, o mecanismo de silenciamento gênico em *M. pernicioso* pode ser ilustrado de forma simplificada conforme a Figura 14: se inicia com a geração de RNA aberrante (aRNA) a partir de material genético exógeno ou endógeno (pequenos RNAs não-codificantes - sncRNAs, transposons) (1). aRNA é transformado em RNA de fita dupla (dsRNA) a partir da ação de uma enzima da classe das RNA-polimerases

dependentes de RNA (RdRPs, descrita em *N. crassa* como QDE-1) (2). O dsRNA é então clivado por ribonucleases da classe das *Dicers* (DCL) em pequenos RNAs de interferência (siRNAs), com tamanho fixo entre 19 e 25 nucleotídeos (3). Os siRNAs são incorporados no *RNA-induced silencing complex* (RISC) por meio de proteínas Argonautas (identificadas em *N. crassa* como QDE-2) que farão parte dele juntamente com outras proteínas acessórias (4). RISC é então ativado e usa a fita guia do siRNA para identificar RNA mensageiros (mRNA) complementares (5) que são então degradados pela atividade endo e exonucleolítica da Argonauta e leva ao silenciamento gênico pós-transcricional ao evitar a formação da respectiva proteína (6). A fita passageira que foi eliminada do siRNA é então usada como molde para RdRPs gerarem novos siRNAs secundários que levam a amplificação do silenciamento, retroalimentando o ciclo (7).

Figura 14. Esquema simplificado das etapas e componentes do silenciamento gênico canônico com os genes encontrados no genoma de *M. pernicioso*



4.2.2. Análise de expressão dos genes da rota de processamento canônico de pequenos RNAs proposta para *M. perniciosa*

A partir do banco de dados genômicos e de expressão de *M. perniciosa* (Teixeira et al., 2014 – disponível em WBD ATLAS <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>) proveniente do sequenciamento massivo de RNA (RNA-seq), são apresentados o RPKM dos genes essenciais do silenciamento gênico canônico, para *Dicers*, Argonautas e *RdRPs*, respectivamente (Tabelas 5, 6 e 7).

Os dados das Tabelas 5, 6 e 7 estão dispostos em ordem cronológica seguindo o ciclo da interação *M. perniciosa* X *T. cacao*, do esporo, passando pelas fases biotróficas, necrotróficas e finalizando com a última etapa do ciclo de vida do fungo (formação do basidiomata) (Evans, 2016).

Para efeito comparativo, foram inseridos dois genes constitutivos de manutenção da atividade celular de fungos, um deles relacionado a atividade da actina (MP12238) e outro da beta-tubulina (MP08695).

Tabela 5. Expressão dos genes *Dicers* encontrados no genoma de *M. perniciosa* em RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) em função da condição biológica em que infestam cacauzeiro

Condição Biológica	<i>Dicer</i>			<i>β-tubulina</i>	<i>actina</i>
	MP10442	MP14055	MP01869	MP08695	MP12238
Esporos não-germinados	9	5	3	7	192
Esporos germinando	5	2	5	5	138
Micélio monocariótico (7 d)	15	13	3	42	119
Micélio monocariótico (14 d)	15	17	3	44	95
Micélio monocariótico (28 d)	25	24	6	86	157
Micélio dicariótico (7 d)	18	15	3	22	75
Micélio dicariótico (14 d)	31	14	2	39	154
Micélio dicariótico (28 d)	21	15	5	82	144
Vassoura verde (30 DAI)	19	11	6	132	133
Necrose inicial (47 DAI)	15	7	1	67	99
Necrose avançada (66 DAI)	15	13	2	39	84
Vassoura seca (111 DAI)	5	7	1	5	74
Primordia	45	21	18	40	146
Basidiomata	23	9	9	39	336



Tabela 6. Expressão dos genes Argonautas encontrados no genoma de *M. pernicioso* em RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) em função da condição biológica em que infestam cacaueteiro

Condição Biológica	Argonauta										β -tubulina actina	
	MP13872	MP08788	MP08974	MP07032	MP08202	MP03267	MP03238	MP10832	MP03288	MP13876	MP08695	MP12238
Esporos não-germinados	30	214	75	1	63	36	32	62	3	3	7	192
Esporos germinando	16	40	8	0	63	11	10	34	1	1	5	138
Micélio monocariótico (7 d)	58	103	159	52	32	25	46	19	5	9	42	119
Micélio monocariótico (14 d)	65	183	197	35	46	27	47	18	13	27	44	95
Micélio monocariótico (28 d)	79	159	219	73	97	151	17	30	3	2	86	157
Micélio dicariótico (7 d)	56	50	165	75	18	23	8	21	10	1	22	75
Micélio dicariótico (14 d)	88	36	130	133	114	38	20	7	1	6	39	154
Micélio dicariótico (28 d)	79	79	119	31	52	194	17	25	3	3	82	144
Vassoura verde (30 DAI)	63	76	24	0	8	34	32	4	7	5	132	133
Necrose inicial (47 DAI)	139	59	26	0	15	24	21	9	8	3	67	99
Necrose avançada (66 DAI)	72	76	39	2	23	22	11	9	1	3	39	84
Vassoura seca (111 DAI)	57	157	61	10	31	8	7	12	3	2	5	74
Primordia	546	168	124	124	133	110	43	11	35	8	40	146
Basidiomata	457	116	80	48	73	36	40	7	73	15	39	336



Tabela 7. Expressão dos genes RdRPs encontrados no genoma de *M. pernicioso* em RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) em função da condição biológica em que infestam cacauero

Condição Biológica	RdRP							<i>β-tubulina</i>	<i>actina</i>
	MP02297	MP11137	MP02213	MP15899	MP09882	MP10417	MP08656	MP08695	MP12238
Esporos não germinando	52	5	12	5	14	2	7	7	192
Esporos germinando	14	8	8	3	7	0	3	5	138
Micélio monocariótico (7 d)	51	37	14	7	4	2	5	42	119
Micélio monocariótico (14 d)	48	44	16	9	5	3	7	44	95
Micélio monocariótico (28 d)	93	32	23	21	16	8	16	86	157
Micélio dicariótico (7 d)	53	6	13	11	12	3	5	22	75
Micélio dicariótico (14 d)	87	84	15	24	5	4	9	39	154
Micélio dicariótico (28 d)	73	11	13	21	6	9	15	82	144
Vassoura verde (30 DAI)	21	8	31	5	1	7	10	132	133
Necrose inicial (47 DAI)	12	7	22	8	2	4	8	67	99
Necrose avançada (66 DAI)	26	7	18	5	3	2	6	39	84
Vassoura seca (111 DAI)	12	0	6	4	4	2	1	5	74
Primordia	58	100	36	59	16	5	9	40	146
Basidiomata	31	44	9	11	6	5	10	39	336



As *Dicers* identificadas como MP14055 (*Dicer-like 1*) e MP10442 (*Dicer-like 2*) se mostraram mais expressas do que MP01869, que apresentou níveis médios a baixos de expressão em todas as condições, exceto no primórdio do corpo de frutificação (basidiomata). A *Dicer* de maior expressão é a *Dicer-like 2* (MP10442). Isto corrobora o que foi pontuado por Nicolás e Ruiz-Vazquez (2013), que cita DCL-2 como a principal componente do silenciamento gênico canônico em células somáticas de fungos, enquanto DCL-1 atua redundantemente, porém em menor intensidade; por outro lado, DCL-1 é imprescindível para o silenciamento que ocorre no ciclo sexuado de fungos (conhecido como MSUD) (Alexander et al., 2008).

Corroborando esta informação, nota-se na Tabela 5 claramente a mesma tendência de expressão de MP14055 (*Dicer-like 1*) e MP10442 (*Dicer-like 2*) em todas as fases, sempre com predomínio de maior expressão de *Dicer-like 2* (MP10442). Assim, é provável que MP14055 (*Dicer-like 1*) e MP10442 (*Dicer-like 2*) sejam genes parálogos, originados a partir de um mesmo ancestral comum e que nesse caso tenham mantido a mesma funcionalidade. A presença de mais de uma cópia de um gene pode conferir vantagem evolutiva ao organismo, sendo uma fonte a mais de material genético para mutação e surgimento de novas funções, mas principalmente é essencial para a sobrevivência daquele organismo para se evitar o risco de depender de uma única cópia gênica em funções vitais (Moreira; López-García, 2011).

Outro ponto observado na análise de expressão de MP14055 (*Dicer-like 1*) e MP10442 (*Dicer-like 2*) é que durante todo o ciclo de vida, desde a formação do micélio monocariótico biotrófico até o final da fase necrotrófica (necrose avançada de tecido infectado) ambas se mantêm expressas, sugerindo que sejam importantes para manutenção do processo patogênico que se dá de forma lenta no ciclo biotrófico de *M. pernicioso*.

Para as Argonautas (Tabela 6), quatro delas encontradas no genoma de *M. pernicioso* (MP03238, MP10832, MP03288 e MP13876) apresentam baixa expressão e não se destacam em nenhuma das condições como mais expressas, podendo exercer função redundante as demais (MP13872, MP08788, MP08974, MP07032, MP08202 e MP03267) ou ainda não serem funcionais.

Considerando as seis Argonautas mais expressas (MP13872, MP08788, MP08974, MP07032, MP08202 e MP03267), em todas observa-se o aumento de expressão conforme evolui o desenvolvimento do micélio monocariótico da fase biotrófica de 7 até 28 dias. Em MP13872, o aumento foi de 58 para 79 RPKM

(de 7 dias até 28 dias, respectivamente); em MP08788 de 103 para 159 RPKM; em MP08974 de 159 para 219 RPKM; em MP07032 de 52 para 73; em MP08202 de 32 para 97; e em MP03267 de 25 para 151. Portanto, este aumento variou de 36 a 500%, acompanhando consistentemente a evolução do desenvolvimento do micélio biotrófico, o que evidencia possível papel dessa classe de genes previamente a patogênese real de *M. perniciosa*, que se dá nas fases de Vassoura verde (30 DAI), Necrose inicial, Necrose avançada (47 DAI) e Vassoura seca (111 DAI). Isto sugere que, com a progressão do micélio monocariótico biotrófico e colonização da planta antes da emissão da vassoura verde, há intensa ativação de genes Argonautas. O destaque é dado para as Argonautas MP13872, MP08788 e MP08974 que se mantêm altamente expressas em praticamente todas as condições biológicas.

No caso específico da Argonauta MP03267, houve aumento exponencial de expressão de 7 a 28 dias tanto em micélio monocariótico (ciclo biotrófico), de 25 para 151 RPKM, como também em dicariótico (ciclo necrotrófico, de 23 para 194 RPKM).

Algumas delas, como MP13872, tem aumento da expressão no início da necrose; outras, como MP08974 são mais expressas nas fases que antecedem os sintomas, durante a progressão dos micélios mono e dicarióticos; outras ainda, tem acentuamento da expressão na emissão da vassoura seca (MP08788); em conjunto, as Argonautas parecem ter importante papel na infecção de *M. perniciosa* sobre *T. cacao*, por vezes redundantes e por vezes sobrepostos nas distintas fases da interação.

Para *RdRPs* (Tabela 7), há novamente maior expressão nas fases de primórdio e micélio mono e dicariótico. Os genes MP09882, MP10417, MP08656 apresentam baixa expressão nas condições contempladas e talvez não sejam funcionais. As demais *RdRPs* (MP02297, MP11137, MP02213 e MP15899) atuam nas condições semelhantes as observadas para *Dicers* e Argonautas. Destaca-se alta expressão de MP02297 (> 10 RPKM) em todas as fases.

Teixeira et al. (2014) apontaram que na condição de vassoura verde, proteínas efetoras de virulência e patogenicidade de fungos (como cerato-plataninas e quintina deacetilases) bem como aquelas relacionadas à defesa das plantas contra patógenos, como genes codificantes de proteínas PR (*pathogenesis-related*) se mostraram altamente expressas. Proteínas PR são componentes do sistema imune das plantas e induzidas por estresses bióticos e abióticos, como por exemplo na presença de fitopatógenos e agem como moléculas sinalizadoras de defesa para ativação da

resistência sistêmica adquirida (Ali et al., 2018). No patossistema *M. pernicioso* X *T. cacao*, é esperado que esta ativação se dê numa tentativa de suprimir a infecção e colonização dos tecidos vegetais pelo patógeno.

Os genes aqui estudados (*Dicers*, *Argonautas* e *RdRPs*), por sua vez, se mostram mais importantes antecipadamente a sintomatologia de vassoura verde, condição na qual muitos destes genes tiveram redução de expressão. Se expressam de forma mais proeminente em outras fases, notadamente micélio monocariótico ou micélio dicariótico e também na formação do primórdio e basidiomata (corpo de frutificação).

Um fato intrigante é a grande expressão observada nas três classes de genes da rota canônica de processamento de pequenos RNAs (*Dicers*, *Argonautas* e *RdRPs*) nas fases finais do ciclo de vida necrotrófico do patógeno: primórdio e basidiomata. Para as três classes, o maior valor de expressão de um gene dentre todas as condições biológicas ocorreu na fase de primórdio dos basidiocarpos: *Dicers* em MP10442 (45 RPKM), *Argonautas* em MP13872 (546 RPKM) e *RdRPs* em MP11137 (100 RPKM). Por ocorrer nos três grupos de genes essenciais que funcionam de forma interligada e coordenada no processamento de pequenos RNAs, que provavelmente estão atuando em processos biológicos relacionados a regulação da expressão gênica, no desenvolvimento e diferenciação celular de novas estruturas, no caso primórdios, basidiomatas e formação de esporos. Laul et al. (2018) relatou fato semelhante no basidiomiceto *Coprinopsis cinerea*, em que miRNA estão envolvidos na regulação do desenvolvimento do corpo de frutificação.

Outra hipótese que se abre é que, em função da manutenção de níveis altos de expressão de vários genes das três classes (*Dicers*, *Argonautas* e *RdRPs*) durante a fase biotrófica, eles estejam de alguma forma relacionados a extensa duração do estágio biotrófico em *M. pernicioso*, sabidamente longo quando comparado a outros fungos com ciclo de vida hemibiotrófico e cujos motivos ainda não estão completamente elucidados.

Por fim, por serem consideravelmente expressos em condições importantes tanto durante a fase biotrófica (micélio monocariótico) como na fase necrotrófica (micélio dicariótico), os genes do processamento de pequenos RNAs (*Dicers*, *Argonautas* e *RdRPs*) surgem como potenciais candidatos no estudo de patogenicidade em *M. pernicioso* da mesma forma que foram descritos em outros

patossistemas, como *B. cinerea* em diversos hospedeiros e *Verticillium dahliae* em *A. thaliana* (Wang et al., 2016).

Com os resultados experimentais do item a seguir (4.3 Transformação de MT para expressar *Dicers* de *M. perniciosa*), será possível elucidar o papel que uma destas classe (*Dicers*), têm como efetores ou na manipulação do sistema de defesa vegetal durante a interação patogênica de *M. perniciosa* sobre tomateiro MT e possivelmente *T. cacao*.

4.3. Transformação de MT para expressar *Dicers* de *M. perniciosa*

Para explorar a possibilidade de controlar a infecção por *M. perniciosa* pelo silenciamento de genes essenciais para o desenvolvimento e/ou a patogênese, foram buscados genes alvos para silenciamento a serem expressos em tomateiro MT. Baseado em informações obtidas em outros patossistemas (Wang et al., 2016), optou-se por silenciar as *Dicers* encontradas no genoma de *M. perniciosa* (MP14055, MP10442 e MP01869, respectivamente *MpDCL-1*, *MpDCL-2* e *MpDCL-3*).

Com a produção de uma planta de tomateiro transgênico expressando fragmentos de *Dicers* de *M. perniciosa* em *hairpin*, espera-se que as plantas de MT transformadas, ao expressarem a construção *MpDCL-1/2/3*, terão os hairpins processados em siRNAs complementares e capazes de silenciar as *Dicers* de *M. perniciosa*, levando a uma menor patogenicidade e capacidade infectiva por parte do fungo, caso este fungo utilize pequenos RNAs como efetores – hipótese a ser confirmada neste patossistema.

Para isso, conduziu-se uma análise dos genes presumíveis de *M. perniciosa*, apresentados na Tabela 8 com números de acesso, tamanho do gene e proteína formada por cada uma das *Dicers*. A construção proposta contém fragmentos para expressar no mesmo vetor as três *Dicers* e foi denominada de *MpDCL-1/2/3*.

Tabela 8. Sequências de *Dicers* encontradas no genoma de *Moniliophthora perniciosa*

Dicer	Número de acesso WBD Atlas¹	Tamanho do gene	Tamanho da proteína
<i>MpDCL-1</i>	MP14055	4.212 pb	1.403 aa
<i>MpDCL-2</i>	MP10442	4.476 pb	1.491 aa
<i>MpDCL-3</i>	MP01869	3.930 pb	1.309 aa

Fonte: Teixeira et al. (2014) – disponível em WBD ATLAS Disponível em <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>

Um dos pontos de preocupação ao se transformar plantas para expressar precursores de pequenos RNAs é prever qual o efeito esta transformação teria sobre a própria planta em que se objetiva inserir a construção gênica, no caso a construção *MpDCL-1/2/3*, pois é sabido que o mecanismo e genes componentes são altamente conservados em eucariotos e o seu silenciamento pode impactar em funções vitais à planta.

A maioria das plantas codificam quatro *Dicers*, cada uma especializada na produção de uma classe de pequenos RNAs (Margis et al., 2006). Em *A. thaliana*, *Dicer 1* produz microRNAs a partir de *hairpins* precursores, parcialmente complementares ao RNA mensageiro alvo (Reinhart et al., 2002), enquanto as *Dicers 2 a 4* produzem pequenos RNAs de interferência (siRNAs), com 21 a 24 nucleotídeos com complementariedade perfeita (Xie et al., 2004).

Em seguida, para a predição de quais siRNAs seriam formados após a expressão da construção *MpDCL-1/2/3* adotou-se o programa *GenScript siRNA Target Finder* (<https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder>) com o objetivo de prever possíveis pareamentos dos siRNAs formados no genoma de MT que se visava transformar. Com isto, detectou-se a formação de 10 possíveis siRNAs com 21 nucleotídeos (Tabela 9) e com as sequências destes siRNA preditos, buscou-se no genoma de tomateiro por meio da ferramenta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se haveria chance significativa de os siRNAs se anelarem e causarem anormalidades genéticas na planta transformada. Observou-se que, apesar da alta similaridade, nenhuma delas tem pareamento completo com qualquer gene funcional de tomateiro, o que é mandatório para que siRNAs sejam funcionais. O pareamento variou de 9 a 15 nucleotídeos para um total potencial de 21 quando de fato ocorreria anelamento e indesejado silenciamento gênico.

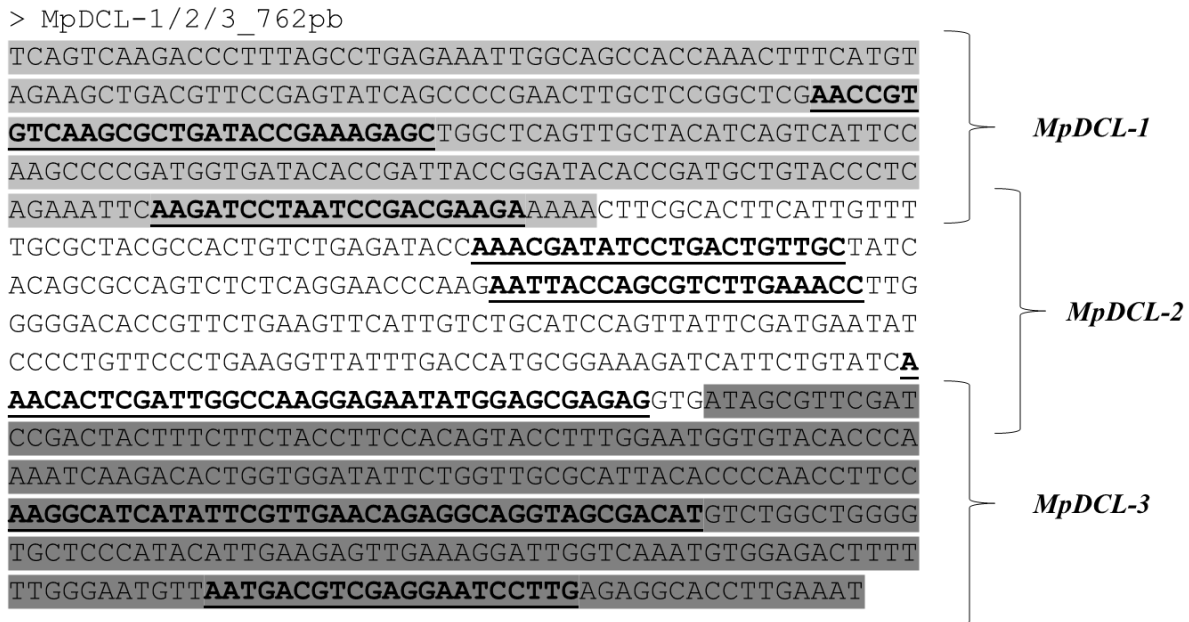
Tabela 9. Predição de siRNAs formados a partir da expressão da construção pK7GWIWG(II)::MpDCL-1/2/3

siRNA previsto	Sequência
1	AAGGCATCATATTCGTTGAAC
2	AAGCGCTGATACCGAAAGAGC
3	AAGATCCTAATCCGACGAAGA
4	AAGGAGAATATGGAGCGAGAG
5	AACCGTGTCAAGCGCTGATAC
6	AACAGAGGCAGGTAGCGACAT
7	AATGACGTTCGAGGAATCCTTG
8	AAACACTCGATTGGCCAAGGA
9	AATTACCAGCGTCTTGAAACC
10	AAACGATATCCTGACTGTTGC

Outro ponto importante verificado foi que dos 10 siRNA preditos (em negrito abaixo destacados na Figura 15), pelo menos um deles se anelaria na construção, indicando que haverá regulação negativa da transcrição da respectiva *Dicer* correspondente de *M. pernicioso*. Foi constatado que todas as três *Dicers* serão atingidas por pelo menos um dos siRNA preditos de serem formados.

Logo, com estas análises foi possível afirmar que os siRNAs gerados pelo tomateiro deverão apresentar especificidade exclusiva às *Dicers* de *M. pernicioso*, levando à ativação do mecanismo de silenciamento gênico somente sobre transcritos do fungo.

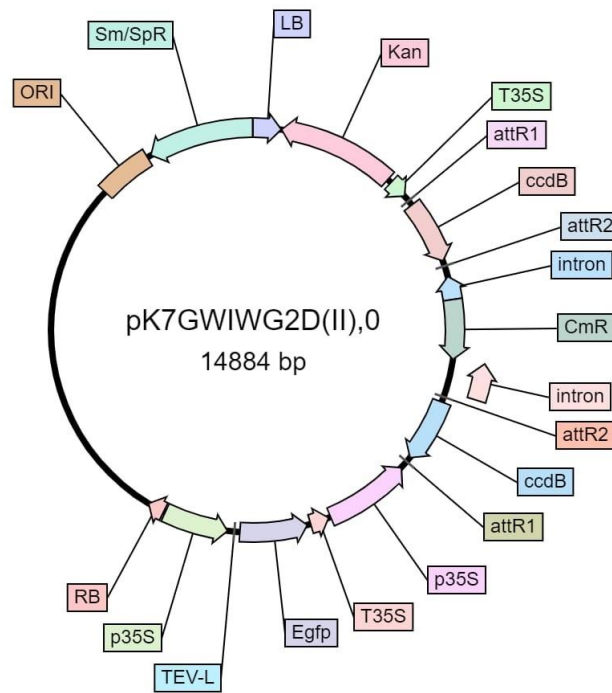
Figura 15. Representação esquemática de fragmentos que compõem a sequência *MpDCL-1/2/3* que originarão cada uma das *Dicers* de *M. pernicioso* (*MpDCL-1*, *MpDCL-2*, *MpDCL-3*) e a localização de cada siRNA predito



Na Figura 16, apresenta-se o vetor de silenciamento pK7GWIWG2(II), contendo o promotor CaMV35S, os *primers* concatenados dos genes MP14055 (*Dicer-like 1*), MP10442 (*Dicer-like 2*) e MP01869 (*Dicer-like 3*), genes de resistência a antibióticos, íntron e terminador 35S feita a partir do software <http://www.molbiotools.com>.

Figura 16. Representação do vetor de silenciamento pK7GWIWG2(II), contendo o promotor CaMV35S, os primers concatenados dos genes MP14055 (*Dicer-like 1*), MP10442 (*Dicer-like 2*) e MP01869 (*Dicer-like 3*), genes de resistência a antibióticos, íntron e terminador 35S

pK7GWIWG2D(II),0
14884 bp



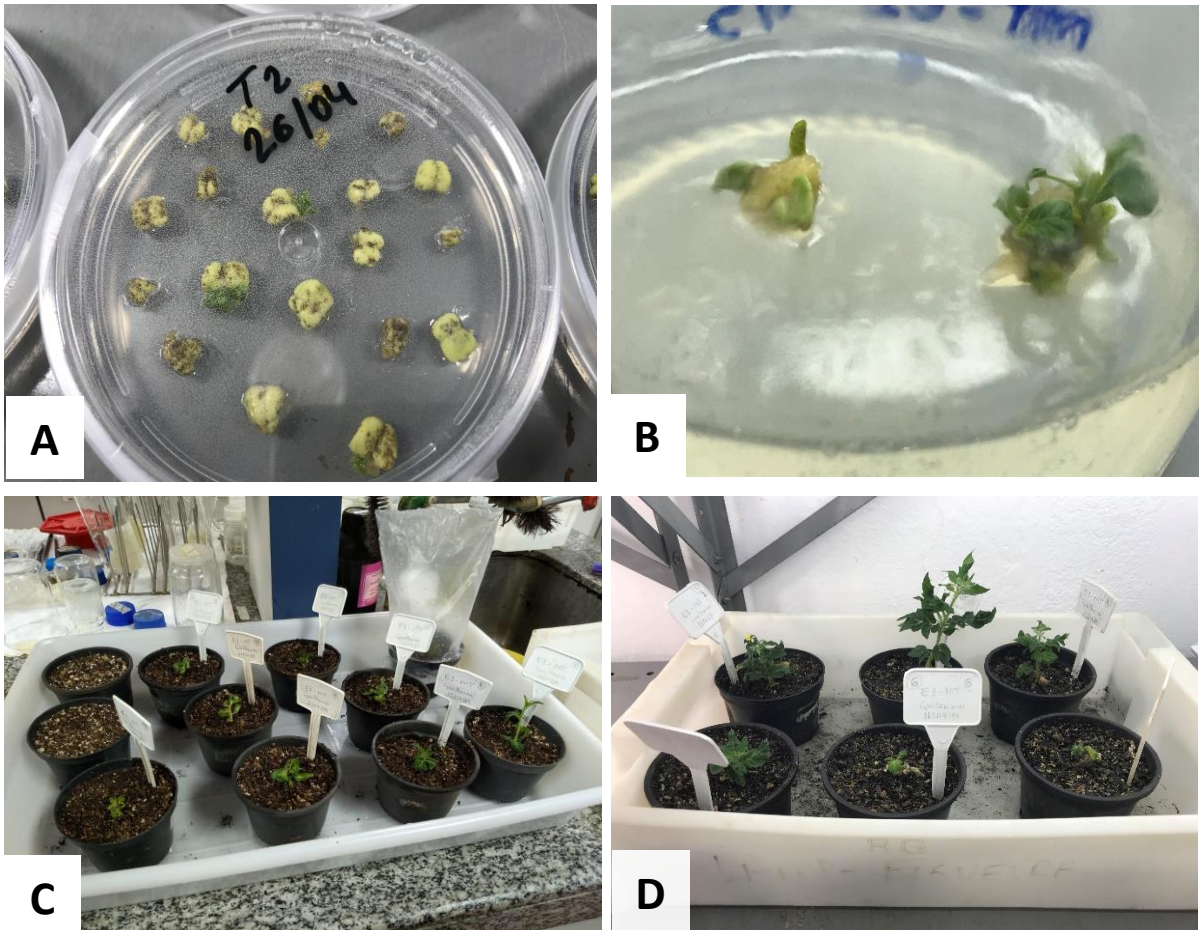
WebDSV v2.0

www.molbiotools.com

Fonte: <http://www.molbiotools.com>

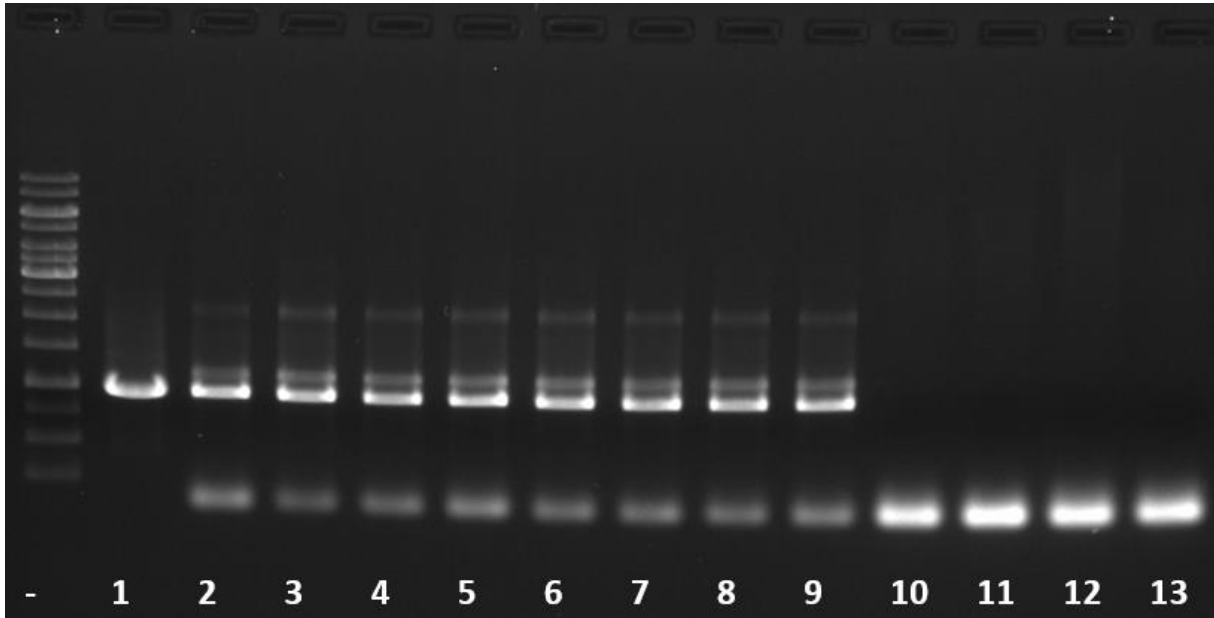
Foram realizados dois experimentos de transformação de MT com *Agrobacterium* empregando a construção pK7GWIWG2(II)::MpDCL-1/2/3. Apenas em um deles obtiveram-se plantas que sobreviveram a todas as fases de regeneração, enraizamento e resistentes aos antibióticos até o momento (Figura 17), restando ao final da aclimação quatro plantas sobreviventes.

Figura 17. Regeneração de plantas MT-DCL1/2/3 contendo a construção DCL1/2/3 do primeiro (A) e segundo (B) eventos em meio de enraizamento; plantas do primeiro evento em aclimação (C); plantas sobreviventes usadas para as confirmações de transformação (D)



Estas plantas foram então submetidas a confirmação da transgenia através da extração do DNA das folhas em duas sub-amostras por planta e comparadas com um controle positivo contendo somente o vetor de silenciamento pK7GWIWG(II) *MpDCL-1/2/3*, três amostras de tomateiros MT não transformados e controle negativo somente com reagentes da reação (branco). Ao final da amplificação (Figura 18), confirmou-se a inserção da construção *MpDCL-1/2/3* nas plantas de MT. Trata-se da sequência de 13 amostras (esquerda para direita), sendo: 01 - CP (controle positivo vetor pK7GWIWG(II) *MpDCL-1/2/3*); Plantas transformadas (02 a 09) 02 - Planta A (folha 01), 03 - Planta A (folha 2), 04 - Planta 02 (folha 1), 05 - Planta 02 (folha 2), 06 - Planta 03 (folha 1), 07 - Planta 03 (folha 2), 08 - Planta D (folha 1), 09 - Planta D (folha 2); 10 - MT não transformado 01, 11 - MT não transformado 02; 12 - MT não transformado 03; 13 Branco.

Figura 18. Gel de 2% agarose contendo a amplificação específica da construção DCL-1/2/3 no vetor de silenciamento pK7GWIWG2(II). Marcador de peso molecular de 1 KB (Fermentas)



Wang et al. (2016) trabalhando com plantas de *A. thaliana* e tomateiro transformados para expressar *Dicers* e Argonautas do fungo *B. cinerea*, descobriram que o silenciamento destes genes leva a uma redução expressiva na patogenicidade do fungo. Outros fungos de importância fitopatogênica também tiveram resultados positivos com abordagem semelhante, mas silenciando outros genes essenciais ao fungo, como *Avr10* de *Blumeria graminis* (Nowara et al., 2010), *Avr3a* de *Phytophthora capsici* (Vega-Arreguín et al., 2014), e diversos genes de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *P. graminis* f. sp. *tritici* (Yin et al., 2011) e de *Fusarium* spp. (Ghag et al., 2014; Koch et al., 2013), evidenciando experimentalmente que a abordagem HIGS tem potencial de uso comercial como estratégia de controle de fitopatógenos na agricultura.

Wang et al. (2016) transformou o fungo *B. cinerea* e silenciou suas próprias *Dicers dcl-1* e *dcl-2* isoladamente ou *dcl-1dcl-2* simultaneamente e observou redução significativa na patogenicidade somente no segundo caso, com formação de menores lesões e menor acúmulo de biomassa do fungo em diversos frutos (tomate, morango e uva), folhas de alface e cebola e pétalas de rosa, mostrando a capacidade redundante que uma *Dicer* tem de substituir a função da outra quando silenciadas isoladamente.

Neste caso, apesar da redução na geração de pequenos RNAs, ela não foi completamente eliminada, o que evidencia a existência de rotas de biogênese de pequenos RNAs independentes de *Dicers* como reportado para outros fungos (Lee et al., 2010). Ainda assim, neste trabalho com a geração de plantas transgênicas expressando a construção para as três *Dicers* do fungo, espera-se redução na severidade da infecção de *M. pernicioso*.

À semelhança do que foi exposto em outros patossistemas, visa-se como próximos passos a continuação dos estudos de avaliação da patogenicidade de *M. pernicioso* sobre as plantas de tomateiro MT *Mp-DCL-1/2/3* recém-selecionadas que serão conduzidas à produção de sementes e germinadas para a seleção de linhagem homocigota. Também estão em andamento novos experimentos de transformação com o vetor pK7GWIWG(II) *MpDCL-1/2/3* para assegurar novos eventos.

Espera-se que plantas na geração T3 serão testadas para infecção por *M. pernicioso*. A hipótese de trabalho assume que *M. pernicioso* utiliza pequenos RNAs como estratégia de aumento da virulência e silenciamento de genes de defesa do hospedeiro e se o silenciamento de componentes do silenciamento em fungos (no caso *Dicers*) pode ser uma estratégia de sucesso para se obter plantas de *T. cacao* resistentes a este importante patógeno.

5. CONCLUSÕES

O inibidor da enzima oxidase alternativa (AOX) '7j-41' foi efetivo em reduzir a severidade e o impacto negativo da infecção *Moniliophthora perniciosa* em tomateiro 'Micro-Tom' no acúmulo de biomassa de raízes, parte aérea e número e peso de frutos quando administrado às raízes por meio de solução nutritiva preventivamente a inoculação com basidiósporos do fungo.

Ainda assim, plantas de tomateiro MT tratadas com o '7j-41' apresentaram considerável fitointoxicação visual, notadamente com necroses e atraso no seu desenvolvimento, o que ficou evidenciado por menores valores de altura média, biomassa seca e contagem de frutos em relação a plantas não tratadas.

Vislumbra-se uma série de novos trabalhos para aumentar o entendimento e aplicação deste e outros compostos inibidores da AOX no estudo do controle de *M. perniciosa*.

Foram encontrados no genoma de *Moniliophthora perniciosa* genes participantes da rota de silenciamento gênico canônico de fungos, incluindo genes essenciais: três *Dicers* (DCL), 10 Argonautas (AGO) e sete RNA-polimerase dependente de RNA (RdRPs), bem como outros atuantes no mecanismo mas não-essenciais: 21 RecQ DNA Helicases, uma Proteína de Replicação A1 (RPA-1) e uma *QDE-2-interacting protein* (QIP).

Pela quantidade de genes essenciais participantes da rota de silenciamento gênico canônico (*Dicers*, Argonautas e RdRPs) ser superior a reportada na maioria das outras espécies fúngicas, associada a alta expressão desses genes em condições importantes durante as fases bio e necrotróficas, estes genes surgem como potenciais alvos de estudo de patogenicidade em *M. perniciosa* sobre seus hospedeiros da mesma forma que foram descritos em outras interações planta-patógeno.

As três classes de genes essenciais *Dicers*, Argonautas e RdRPS têm alta expressão em diversas condições biológicas do desenvolvimento de *M. perniciosa* principalmente nas fases que precedem a emissão da vassoura verde, no micélio monocariótico (biotrófico), dicariótico (necrotrófico) e também ao final do ciclo necrótrfico (formação do primórdio e basidiomata). Foram identificados também genes com baixa expressão, evidenciando que há diferenças importantes no papel desempenhando por eles, mesmo dentro de cada classe.

Plantas transgênicas expressando hairpins com a construção concatenada para expressar as três *Dicers* de *M. pernicioso* (*Mp-DCL1/2/3*) foram obtidas com sucesso e poderão ser usadas em futuros estudos de patogênese. A partir delas, será possível avaliar se *M. pernicioso* usa pequenos RNAs como efetores para aumentar a virulência da sua infecção e desativar os genes de defesa de plantas de tomateiro MT e, possivelmente, de *Theobroma cacao* e estudar se o mecanismo de HIGS (*Host Induced Gene Silencing*) pode ter aplicabilidade experimental ou até mesmo comercial neste patossistema.

REFERÊNCIAS

- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of *Marasmiaceae*. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, p. 1012–1022, 2005.
- ALBUQUERQUE, P. S. B.; BASTOS, C. N.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M. Doenças do cacauzeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Ceres, 2005. v. 2, p. 151-164.
- ALEXANDER, W. G.; RAJU, N. B.; XIAO, H.; HAMMOND, T. M.; PERDUE, T. D. DCL-1 colocalizes with other components of the MSUD machinery and is required for silencing. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 719–727, 2008.
- ALI S.; GANAI, B. A.; KAMILI, A. N.; BHAT, A. A.; MIR, Z. A.; BHAT, J. A.; TYAGI, A.; ISLAM, S. T.; MUSHTAQ, M.; YADAV, P.; RAWAT, S.; GROVER, A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, Jena, v. 212-213, p. 29-37, 2018.
- ALMEIDA, G. M. **Estudo da função biológica da oxidase alternativa (AOX) de *Moniliophthora perniciosa* (fungo da vassoura de bruxa) em *Saccharomyces cerevisiae***. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/D.9.2014.tde-27052015-144918. Acesso em: 2018-08-30, 2014.
- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; CASCARDO, J. C. M.; YAMADA, M. M.; FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* L. in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Heidelberg, v. 105, p. 167-175, 1999.
- ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G. Strobirulins - new antifungal antibiotics from the Basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 30, n. 10, p. 806-810, 1977.
- AVILA-ADAME, C.; KOLLER, W. Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, p. 493–500, 2002.
- AXTELL, M. J.; WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Vive la différence biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. **Genome Biology**, London, v. 12, p. 221, 2011.
- AXTELL, M. J. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 137–59, 2013.
- BAILEY, B. A.; EVANS, H. C.; PHILLIPS-MORA, W.; ALI, S. S.; MEINHARDT, L. W. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 19, p. 1580-1594, 2018.

BARSOTTINI, M. R.; PIRES, B. A.; VIEIRA, M. L.; PEREIRA, J. G.; COSTA, P. C.; SANITÁ, J.; CORADINI, A.; MELLO, F.; MARSCHALK, C.; SILVA, E. M.; PASCHOAL, D.; FIGUEIRA, A.; RODRIGUES, F. H.; CORDEIRO, A. T.; MIRANDA, P. C.; OLIVEIRA, P. S.; SFORÇA, M. L.; CARAZZOLLE, M. F.; ROCCO, S. A.; PEREIRA, G. A. Synthesis and testing of novel alternative oxidase (AOX) inhibitors with antifungal activity against *Moniliophthora perniciosa* (Stahel), the causal agent of witches' broom disease of cocoa, and other phytopathogens. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 75, n. 5, p. 1295-1303, 2019. doi: 10.1002/ps.5243.

BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBZANSKI, B. N. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v.58, n. 7, p. 649–662, 2002.

BATEMAN, R.; ARIAS, D.; GUERRERO, R.; HEBBAR, P.; SÚAREZ CAPELLO, C. Assessing the options for spray interventions to control the moniliophthora disease complex of cocoa in Ecuador. In: Conferencia Internacional en Investigación de Cacao, 15., 2005, San Jose, Costa Rica. Quito, Ecuador: INIAP, 2005. p. 106-111. Disponível em: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3384>. Acesso em: 30 jul. 2019.

BAULCOMBE, D. C. VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 26, p. 141-146, 2015.

BAUR, P.; APONTE, J. Co-penetration of Actives and Adjuvants and its Significance for the Matched Pair Liaison. In: MYUNG, K.; SATCHIVI, N. M.; KINGSTON C. K. (Ed.). **Retention, uptake, and translocation of agrochemicals in plants**. Washington, DC: American Chemical Society, 2014. chap. 2, p. 23–39, 2014. (ACS Symposium Series, 1171).

BEKTAS, Y.; EULGEM, T. Synthetic plant defense elicitors. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 804, 2015.

BENNETT, R. J.; KECK, J. L. Structure and function of RecQ DNA helicases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 39, n. 2, p. 79–97, 2004.

BIMBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BOWERS, J. H.; BAILEY, B. A.; HEBBAR, P. K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R. The impact of plant disease in world chocolate production. **Plant Health Progress**, St. Paul, 2001. doi: 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV.

BROMILOW, R. H.; CHAMBERLAIN, K.; EVANS, A. A. Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicide. **Weed Science**, Champaign, v. 38, p. 305-314, 1990.

CALO, S.; NICOLAS, F. E.; VILA, A.; TORRES-MARTINEZ, S.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M. Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 83, p. 379-394, 2012.

CARIBÉ DOS SANTOS, A. C.; SENA, J. A. L.; SANTOS, S. C.; DIAS, C. V.; PIROVANI, C. P.; PUNGARTINIK, C.; VALLE, R. R.; CASCARDO, J. C. M.; VINCENTZ, M. dsRNA-induced gene silencing in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 825-836, 2009.

CARMELL, M. A.; HANNON, G. J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. **Nature Structural and Molecular Biology**, New York, v. 11, p. 214-218, 2004.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, Cambridge, v. 136, p. 642-655, 2009.

CATALANOTTO, C.; AZZALIN, G.; MACINO, G.; COGONI, C. Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 16, p. 790-795, 2002.

CEITA, G. O.; MACÊDO, J. N. A.; SANTOS, T. B.; ALEMANNI, L.; GESTEIRA, A. S.; MICHELI, F.; MARIANO, A. C.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. M. Involvement of calcium oxalate degradation programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 173, p. 106-117, 2007.

COBB, A. H.; READE, J. P. H. Herbicide uptake and movement. In: **Herbicides and plant physiology**. 2. ed. London: Wiley-Blackwell, 2010. p. 50-68.

COGONI, C.; MACINO, G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 94, p. 10233-10238, 1997.

COLLINS, C. D.; MARTIN, I.; DOUCETTE, W. Plant uptake of xenobiotics. In: SCHRODER, P.; COLLINS, C. D. (Ed.). **Organic xenobiotics and plants: from mode of action to ecophysiology**. Dordrecht: Springer Science, 2010. p. 3-16. (Plant Ecophysiology, 8).

COSTA, J. D. C. B.; RESENDE, M. L. V. D.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; CAMILO, F. R.; MONTEIRO, A. C. A.; PEREIRA, R. B. Induction of resistance in cacao seedlings against *Moniliophthora perniciosa* by a phosphorylated mannan oligosaccharide based product. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 285-294, 2010.

DEGANELLO, J.; LEAL JUNIOR, G. A.; ROCHA, M. L.; PERES, L. E. P.; FIGUEIRA, A. Interaction of *Moniliophthora perniciosa* biotypes with Micro-Tom tomato: A model system to investigate the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, p. 1251-1263, 2014.

DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius pernicius*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 66-72, 1976.

DEREEPER, A.; GUIGNON, V.; BLANC, G.; AUDIC, S.; BUFFET, S.; CHEVENET, F.; CLAVERIE, J. M. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, London, v. 36, p. W465-W469, 2008. Suppl. 2.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, p. 11-15, 1987.

EVANS, H. C. Witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*): History and biology. In: BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. (Ed.). **Cacao diseases: a history of old enemies and new encounters**. Heidelberg: Springer, 2016. p. 137-177.

FAO. **The Future of Food and Agriculture** – Trends and challenges. Rome, 2017.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, p. 806-811, 1998.

FORREST, E. C.; COGONI, C.; MACINO, G. The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. 2123–2128, 2004.

FULCI, V.; MACINO, G. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 10, p. 199–203, 2007.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K.; GANAPATHI, T. R. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 541-553, 2014.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**, London, v. 72, p. 278-289, 1994.

HAHN, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. **Journal of Chemical Biology**, Berlin, v. 7, n. 4, p. 133–141, 2014.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method of growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 31 p. (California Agricultural Experiment Station Circular, 347).

HU, Y.; STENLID, J.; ELFSTRAND, M.; OLSON, Å. Evolution of RNA interference proteins dicer and argonaute in *Basidiomycota*. **Mycologia**, Lancaster, v. 105, n. 6, p. 1489-1498, 2013. doi: 10.3852/13-171.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 5, p. 193-195, 2002.

KAZUTAKA, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, London, bbx108, 2017. doi: 10.1093/bib/bbx108.

KNIP, M.; CONSTANTIN, M. E.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Trans-kingdom Cross-Talk: Small RNAs on the Move. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 10, n. 9, e1004602, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004602>.

KNOWLES, D. A. Formulation of agrochemicals. In: KNOWLES, D. A. (Ed.). **Chemistry and technology of agrochemical formulations**. Dordrecht: Springer, 1998. p. 41-79.

KOCH, A.; KUMAR, N.; WEBER, L.; KELLER, H.; IMANI, J.; KOGEL, K. H. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 110, n. 48, p. 19324-19329, 2013.

KUMAR, R. Role of MicroRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 174, n. 1, p. 93-115, 2014.

LAKER, H. A. Evaluation of systemic fungicides for control of witches' broom disease of cocoa in Trinidad. **Tropical Agriculture**, Trinidad and Tobago, v. 68, p. 119-124, 1991.

LAU A. Y. T.; CHENG, X.; CHENG, C. K.; NONG, W.; CHEUNG, M. K.; CHAN, R. H. F. Discovery of microRNA-like RNAs during early fruiting body development in the model mushroom *Coprinopsis cinerea*. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 9, e0198234, 2018.

LEE, H. C.; CHANG, S. S.; CHOUDHARY, S.; AALTO, A. P.; MAITI, M.; BAMFORD, D. H.; LIU, Y. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. **Nature**, London, v. 459, p. 274–277, 2009.

LEE, H. C.; LEE, H. C.; LI, L.; GU, W.; XUE, Z.; CROSTHWAITE, S. K.; PERTSEMLIDIS, A.; LEWIS, Z. A.; FREITAG, M.; SELKER, E. U.; MELLO, C. C.; LIU, Y. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 38, p. 803-814, 2010.

LI, L.; CHANG, S. S.; LIU, Y. RNA interference pathways in filamentous fungi. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 22, p. 3849-3863, 2010.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LIU, J.; CARMELL, M. A.; RIVAS, F. V.; MARSDEN, C. G.; THOMSON, J. M.; SONG, J. J.; HAMMOND, S. M.; JOSHUA-TOR, L.; HANNON, G. J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, New York, v. 305, p. 1437–1441, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $-2\Delta\Delta C_t$ Method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402–408, 2001.

LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The evolution of fungicide resistance. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 90, p. 29-92, 2015.

MACRAE, I. J.; ZHOU, K.; DOUDNA, J. A. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. **Nature Structural and Molecular Biology**, New York, v. 14, p. 934–940, 2007.

MAITI, M.; LEE, H. C.; LIU, Y. QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 21, p. 590–600, 2007.

MALOY, O. C. **Plant disease management**. St. Paul: APS, 2005. (The Plant Health Instructor). doi: 10.1094/PHI-I-2005-0202-01.

MARELLI, J. P.; MAXIMOVA, S. N.; GRAMACHO, K. P.; KANG, S.; GUILTINAN, M. J. Infection Biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate Solanaceous Hosts. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 2, p. 149-160, 2009.

MARELLI, J. P.; GUEST, D. I.; BAILEY, B. A.; EVANS, H. C.; BROWN, J. K.; JUNAID M.; BARRETO, R. W.; LISBOA, D. O.; PUIG, A. S. Chocolate under threat from old and new cacao diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 109, n. 8, p. 1331-1343, 2019.

MARGIS, R.; FUSARO, A. F.; SMITH, N. A.; CURTIN, S. J.; WATSON, J. M.; FINNEGAN, E. J.; WATERHOUSE, P. M. The evolution and diversification of Dicers in plants, **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 2442–2450, 2006.

MASSOLA JUNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. cap. 8, p. 149-206.

MEDEIROS, F. H. V.; POMELLA, A. W. V.; SOUZA, J. T.; NIELLA, G. R.; VALLE, R.; BATEMAN, R. P.; FRAVEL, D.; VINYARD, B.; HEBBAR, P. K. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 704–711, 2010.

MONDEGO, J. M. C.; CARAZZOLLE, M. F.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; PARIZZI, L. P.; RINCONES, J.; PEREIRA, G. A. G. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 548, 2008.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P. Paralogous gene. In: GARGAUD, M.; AMILS, R., CERNICHARO QUINTANILLA, J., CLEAVES, H.J., IRVINE, W.M., PINTI, D., VISO, M. (Ed.). **Encyclopedia of Astrobiology**. Heidelberg: Springer, 2011.

MOTA, S. G.; BARROS, T. F.; CASTILHO, M. S. In vitro screening and chemometrics analysis on a series of azole derivatives with fungicide activity against *Moniliophthora perniciosa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 21, p. 510-519, 2010.

MUETH, N. A.; RAMACHANDRAN, S. R.; HULBERT, S. H. Small RNAs from the wheat stripe rust fungus (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*). **BMC Genomics**, London, v. 16, p. 718, 2015.

MULQUEEN, P. Recent advances in agrochemical formulation. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 106, p. 83-107, 2003.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 279-289, 1990.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 07 maio 2019.

NICOLAS, F. E.; TORRES-MARTINEZ, S.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M. Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. **EMBO Journal**, Oxford, v. 22, p. 3983–3991, 2003.

NICOLÁS, F. E.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M. Functional Diversity of RNAi-Associated sRNAs in Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 8, p. 15348–15360, 2013.

NOLAN, T.; BRACCINI, L.; AZZALIN, G.; DE TONI, A.; MACINO, G.; COGONI, C. The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 5, p. 1564–1573, 2005.

NOWARA, D.; GAY, A.; LACOMME, C.; SHAW, J.; RIDOUT, C.; DOUCHKOV, D.; HENSEL, G.; KUMLEHN, J.; SCHWEIZER, P. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 3130-3141, 2010.

NUNES, C. C.; DEAN, R. A. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, p. 519-529, 2012.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil**. Ilhéus, BA: Cepec/Ceplac, p. 132, 2005.

PARKER, J. S.; BARFORD, D. Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. **Trends in Biochemical Science**, Kidlington, v. 31, p. 622-630, 2006.

PASCHOAL, D. **Análise metabolômica da interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum***. 2018. 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

PINHEIRO, T. T. **Transformação genética de laranja doce com genes da via biossintética de carotenoides**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. doi:10.11606/T.64.2014.tde-30102014-143222.

PINO, L. E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. S.; SCOTTON, D. C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, p. 23, 2010.

PRADO, P. F. V. **Caracterização dos mecanismos de resistência a estrobirulinas no fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauero**. 2016. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016. Acesso em: 19 ago. 2018.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

REINHART, B. J.; WEINSTEIN, E. G.; RHOADES, M. W.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P. MicroRNAs in plants. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 16, p. 1616–1626, 2002.

RIBEIRO, M. A. Q.; ALMEIDA, F. A. A.; ALVES, T. F. O.; GRAMACHO, K. P.; PIROVANI, C. P.; VALLE, R. R. Rootstock x scion interactions on *Theobroma cacao* resistance to witches' broom: photosynthetic, nutritional and antioxidant metabolism responses. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 38, p. 73, 2016.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 3343–3353, 1992.

ROYAERT, S.; JANSEN, J.; da SILVA, D. V.; de JESUS BRANCO, S. M.; LIVINGSTONE, D. S.; MUSTIGA, G. Identification of candidate genes involved in Witches' broom disease resistance in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L. in Brazil. **BMC Genomics**, London, v. 17, p.107, 2016.

SAIMOTO, H.; KIDO, Y.; HAGA, Y.; SAKAMOTO, K.; KITA, K. Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biochemistry**, Abingdon, v. 153, p. 267–273, 2013.

SANFORD, J.C., JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance - Deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 113, p. 395-405, 1985.

SATCHIVI, N. M. Modeling xenobiotic uptake and movement: A review. In: MYUNG, K.; SATCHIVI, N. M.; KINGSTON C. K. (Ed.). **Retention, uptake, and translocation of agrochemicals in plants**. Washington, DC: ACS, 2014. p. 41–74.

SCARPARI, L. M.; MEINHARDT, L.W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A. W.; SCHIAVINATO, M. A.; CASCARDO, J. C.; PEREIRA, G. A. G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 865–877, 2005.

SCHRODER, P.; SCHEER C. E.; DIEKMANN, F.; STAMPFL, A. How plants cope with foreign compounds - Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 14, n. 2, p. 114-122, 2007.

SCOTTON, D. C.; AZEVEDO, M. D. S.; SESTARI, I.; DA SILVA, J. S.; SOUZA, L. A.; PERES, L. E. P.; LEAL, G. A.; FIGUEIRA, A. Expression of the *Theobroma cacao* Bax-inhibitor-1 gene in tomato reduces infection by the hemibiotrophic pathogen *Moniliophthora pernicios*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1101–1112, 2017.

SIEROTZKI, H.; SCALLIET, G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. **Phytopathology**, St. Paul, v. 103, n. 9, p. 880-887, 2013.

SONG, J. J.; LIU, J.; TOLIA, N. H.; SCHNEIDERMAN, J.; SMITH, S. K.; MARTIENSSEN, R. A.; HANNON, G. J.; JOSHUA-TOR, L. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. **Nature Structural Biology**, New York, v. 10, p. 1026–1032, 2003.

SONG, J. J.; SMITH, S. K.; HANNON, G. J.; JOSHUA-TOR, L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. **Science**, New York, v. 305, p. 1434–1437, 2004.

TEIXEIRA, P. J.; THOMAZELLA, D. P.; PEREIRA, G. A. G. Time for chocolate: current understanding and new perspectives on cacao Witches' broom disease research. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 10, e1005130, 2015.

TEIXEIRA, P. J.; THOMAZELLA, D. P.; REIS, O.; PRADO, P. F.; RIO, M. C.; FIORIN, G. L.; JOSÉ J.; COSTA, G. G.; NEGRI, V. A.; MONDEGO, J. M.; MIECZKOWSKI, P.; PEREIRA G. A. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora pernicios*. **The Plant Cell**. 1;26(11):4245-69, 2014.

THOMAZELLA, D. P.; TEIXEIRA, P. J.; OLIVEIRA, H. C.; SAVIANI, E. E.; RINCONES, J.; TONI, I. M.; REIS, O.; GARCIA, O.; MEINHARDT, L. W.; SALGADO, I.; PEREIRA, G. A. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, Oxford, v. 194, p. 1025–1034, 2012.

TORRES-MARTINEZ, S., RUIZ-VAZQUEZ, R. M. The RNAi Universe in Fungi: A Varied Landscape of Small RNAs and Biological Functions. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 71, p. 371-391, 2017.

TRAPP, S. Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 11, n. 1, p. 33–39, 2004.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, London, v. 40, n. 15, e115, 2012.

VANLERBERGHE, G. C.; CVETKOVSKA, M.; WANG, J. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 137, p. 392–406, 2009.

VEGA-ARREGUÍN, J. C.; JALLOH, A.; BOS, J. I.; MOFFETT, P. Recognition of an Avr3a homologue plays a major role in mediating non-host resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* species. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 27, n. 8, p. 770-780, 2014.

VILLALOBOS-ESCOBEDO, J. M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; CARRERAS-VILLASEÑOR, N. The interaction of fungi with the environment orchestrated by RNAi. **Mycologia**, Lancaster, v. 108, n. 3, p. 556-571, 2016.

WANG, C. J.; LIU, Z. Q. Foliar uptake of pesticides present status and future challenge. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 87, n. 1, p. 1-8, 2007.

WANG, M.; WEIBERG, A.; LIN, F. M.; THOMMA, B. P. H. J.; HUANG, H. D.; JIN, H. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. **Nature Plants**, London, v. 2, art. 16151, 2016.

WANG, M.; WEIBERG, A.; JIN, H. Pathogen small RNAs: a new class of effectors for pathogen attacks. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 219–223, 2015.

WANG, X.; HSUEH, Y. P.; LI, W.; FLOYD, A.; SKALSKY, R.; HEITMAN, J. Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 24, p. 2566-2582, 2010.

WBD TRANSCRIPTOME ATLAS - WBD ATLAS. Disponível em <<http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/wbdatlas/>>. Acesso em: 02 mar. 2018.

WEIBERG, A.; WANG, M.; LIN, F.; ZHAO, H.; ZHANG, Z.; KALOSHIAN, I.; HUANG, H.; JIN, H. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. **Science**, New York, v. 342, p. 118-123, 2013.

WEIBERG, A.; WANG, M.; BELLINGER, M.; JIN., H. Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 52, p. 495-516, 2014.

WEIBERG, A.; BELLINGER, M.; JIN, H. Conversations between kingdoms: small RNAs. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 32, p. 207–215, 2015.

WILSON, R. C.; DOUDNA, J. A. Molecular mechanisms of RNA interference. **Annual Review of Biophysics**, Palo Alto, v. 42, p. 217-39, 2013.

YIN, C.; JURGENSON, J. E.; HULBERT, S. H. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **Molecular Plant-Microbe Interact**, St. Paul, v. 24, n. 5, p. 554-561, 2011.

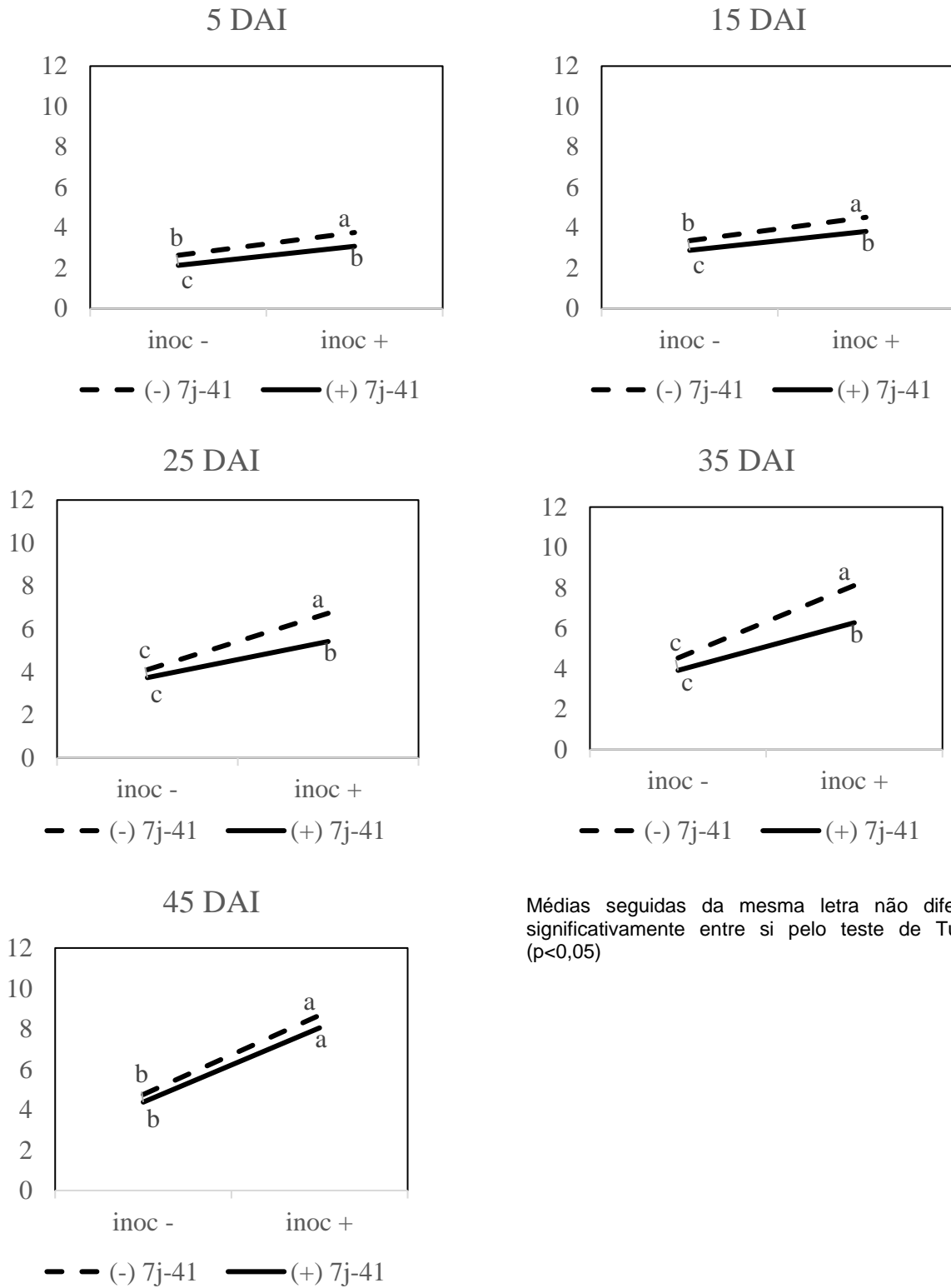
XIE, Z.; JOHANSEN, L.K., A.M.; GUSTAFSON, K.D.; KASSCHAU, A.D.; LELLIS, D.; ZILBERMAN, J.; JACOBSEN, S.E.; CARRINGTON, J.C. Genetic and functional diversification of smallRNA pathways in plants. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 2, E104, 2004.

ZHANG, Z. S.; LIU, M. J.; SCHEIBE, R.; SELINSKI, J.; ZHANG, L. T.; YANG, C.; MENG, X. L.; GAO, H. Y. Contribution of the alternative respiratory pathway to PSII photoprotection in C3 and C4 plants. **Molecular Plant**, Cambridge, v. 10, p. 131–142, 2017.

ZONG, J.; YAO, X.; YIN, J.; ZHANG, D.; MA, H. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. **Gene**, Amsterdam, v. 447, p. 29-39, 2009.

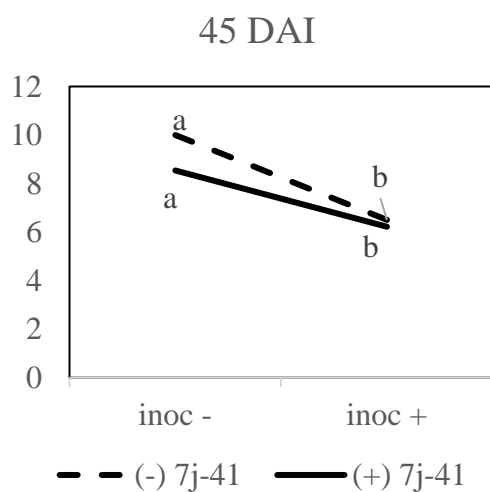
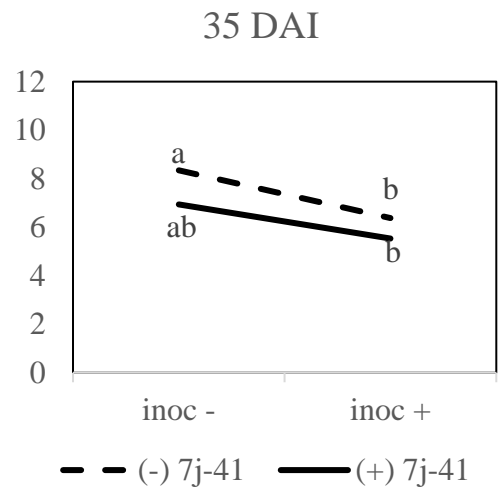
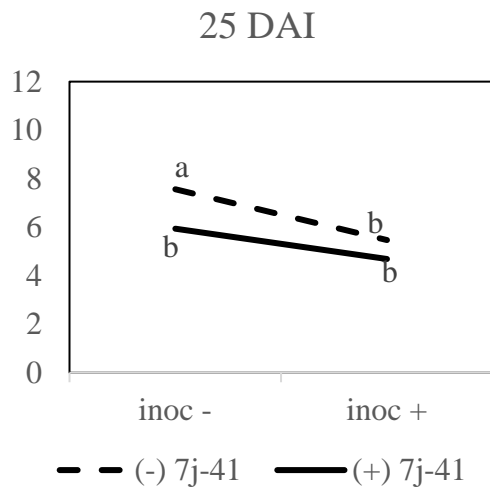
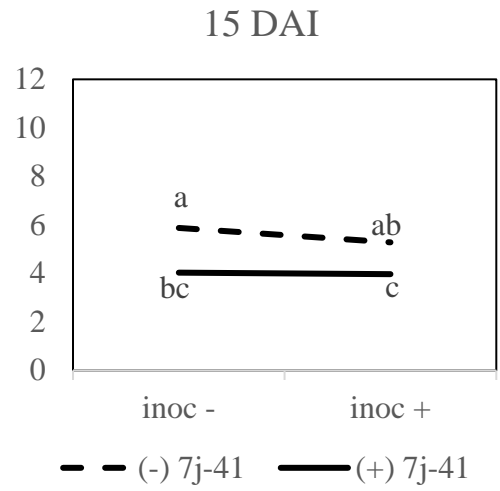
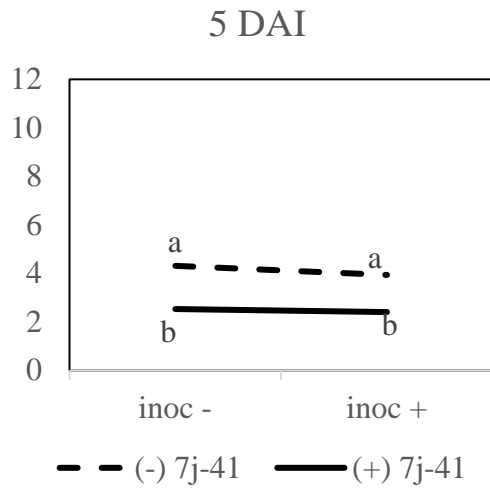
ANEXOS

Anexo A. Análise fatorial das avaliações de diâmetro (mm) de MT.



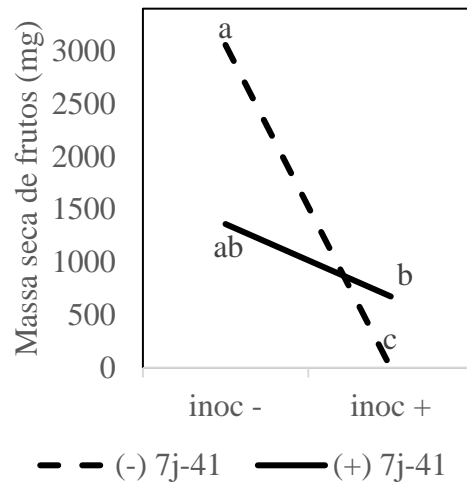
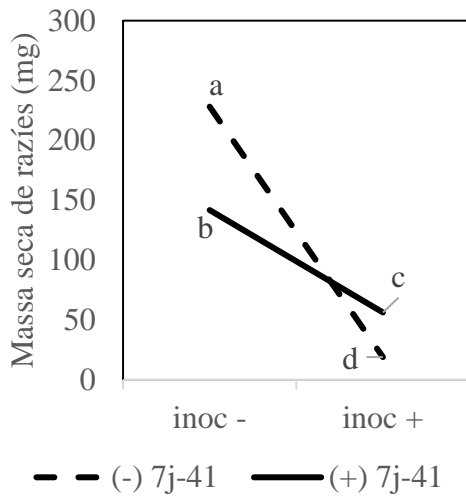
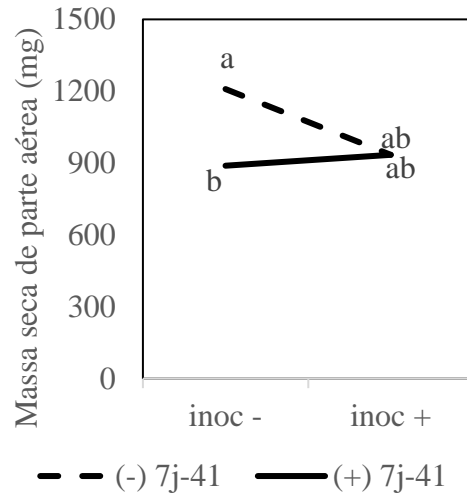
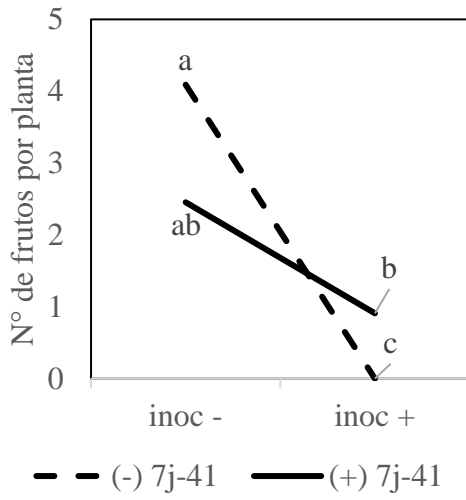
Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Anexo B. Análise fatorial das avaliações de altura (cm) de MT.



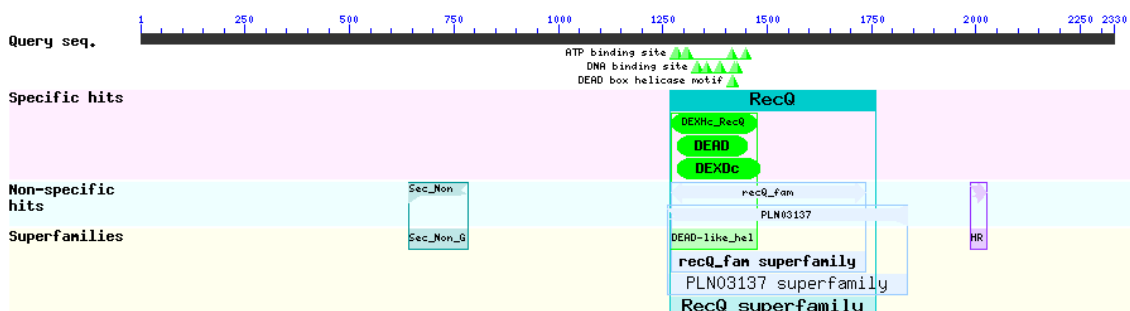
Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Anexo C. Análise fatorial das avaliações finais de biomassa e contagem de frutos de MT.

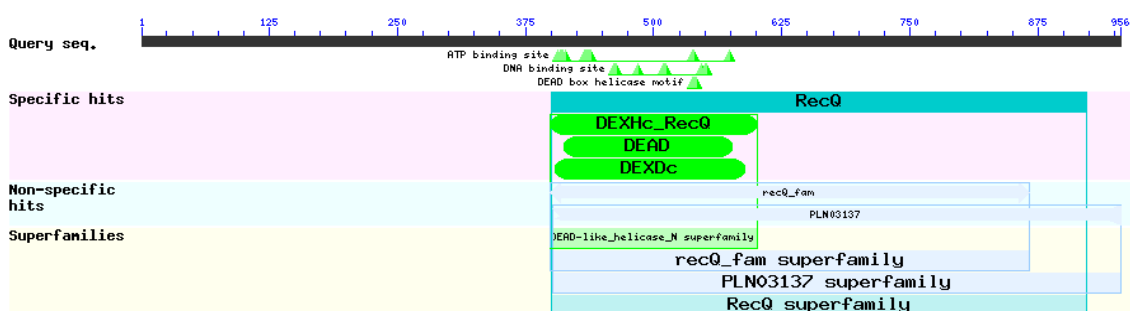


Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

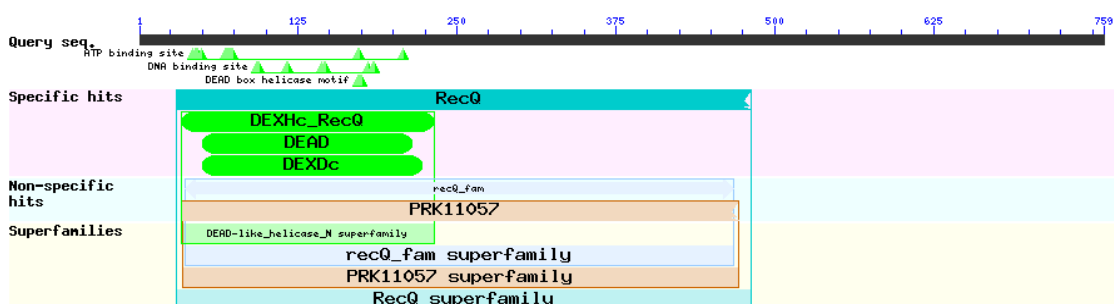
Anexo D. Domínios proteicos conservados das RecQ Helicases (QDE-3) de *N. crassa* e candidatas de *M. perniciososa*.



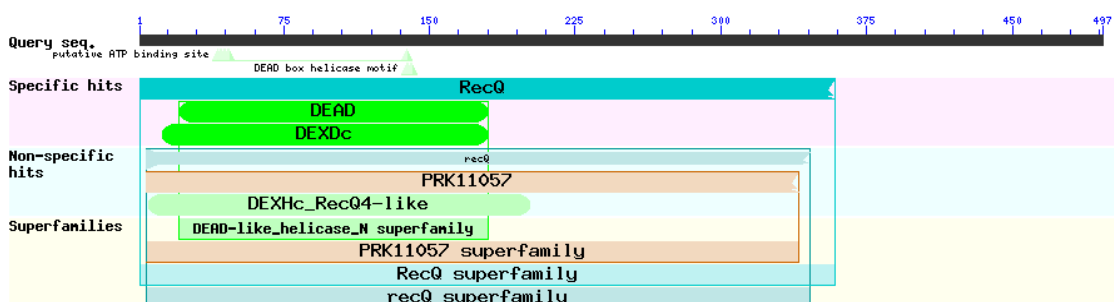
RecQ Helicase QDE-3 *N. crassa*



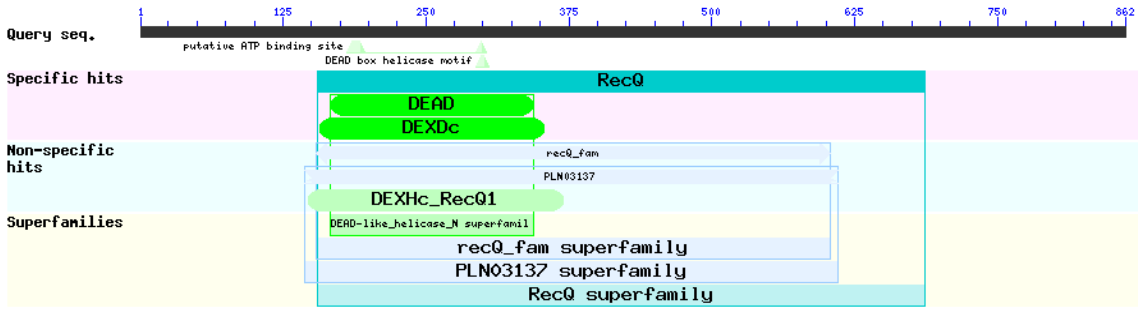
RecQ Helicase MP00763



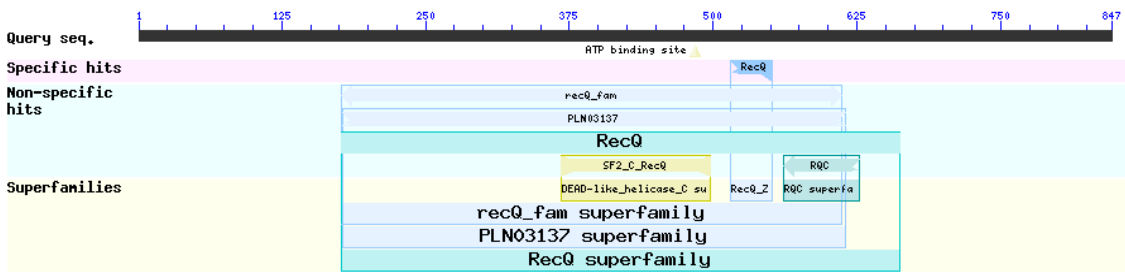
RecQ Helicase MP01699



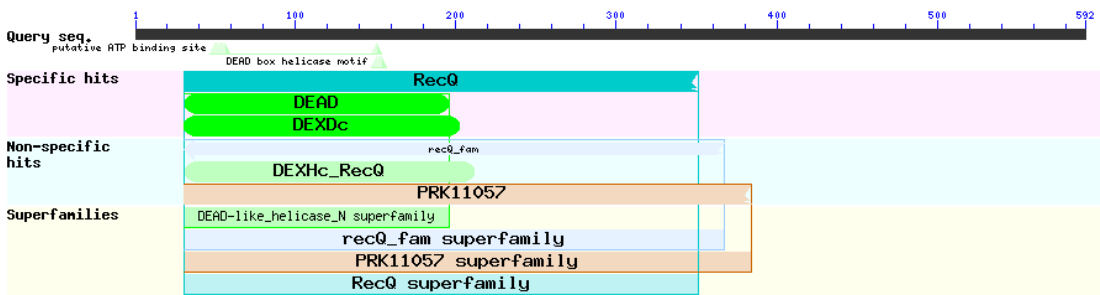
RecQ Helicase MP07550



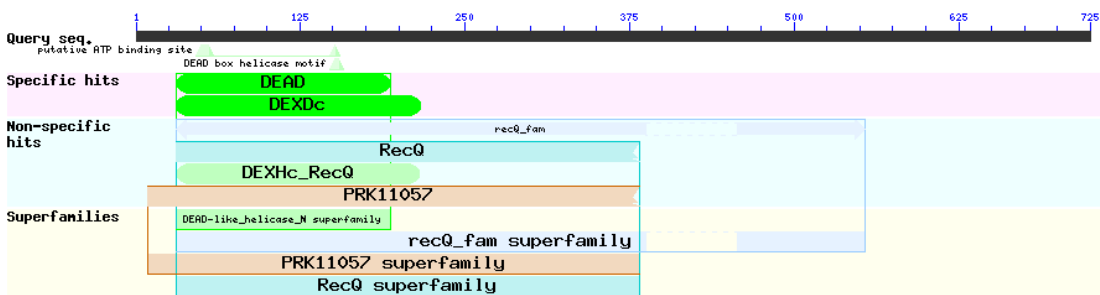
RecQ Helicase MP14995



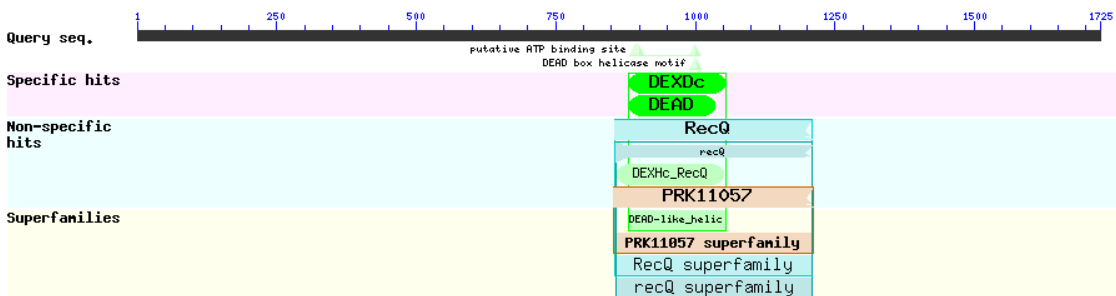
RecQ Helicase MP12489



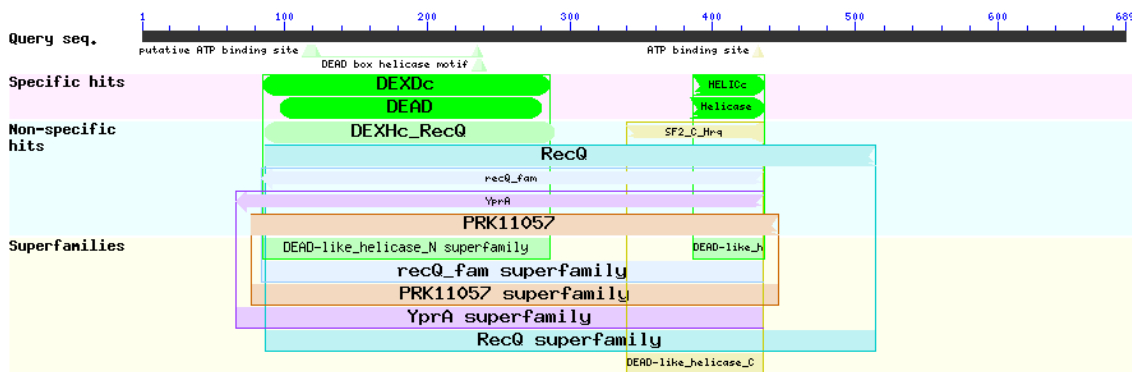
RecQ Helicase MP13589



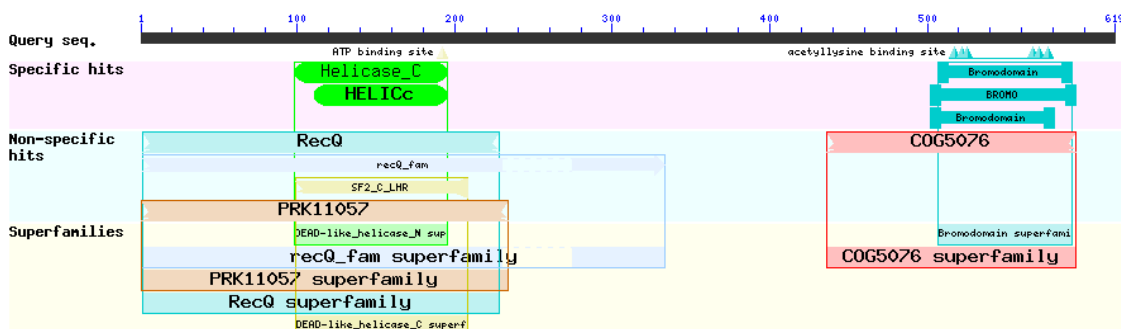
RecQ Helicase MP09541



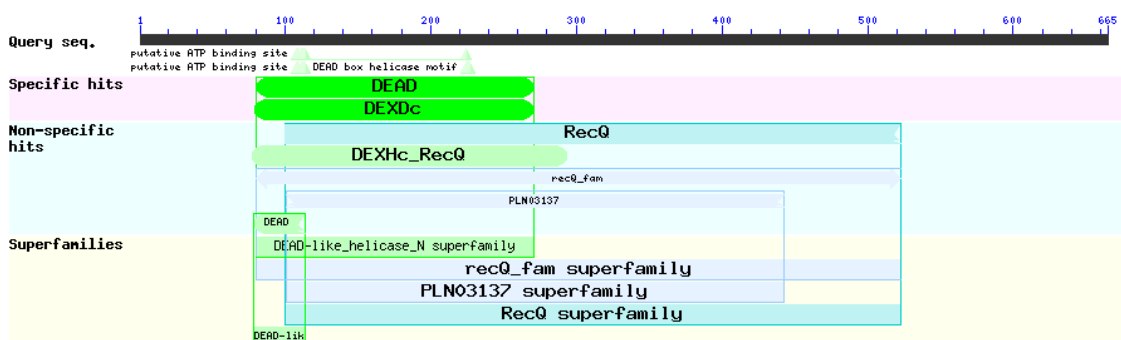
RecQ Helicase MP06392



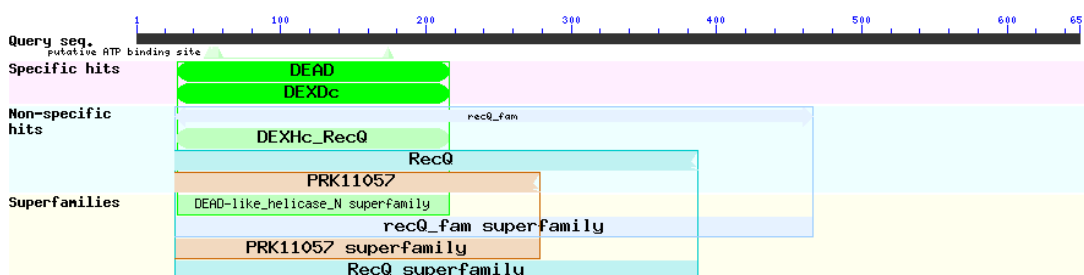
RecQ Helicase MP14167



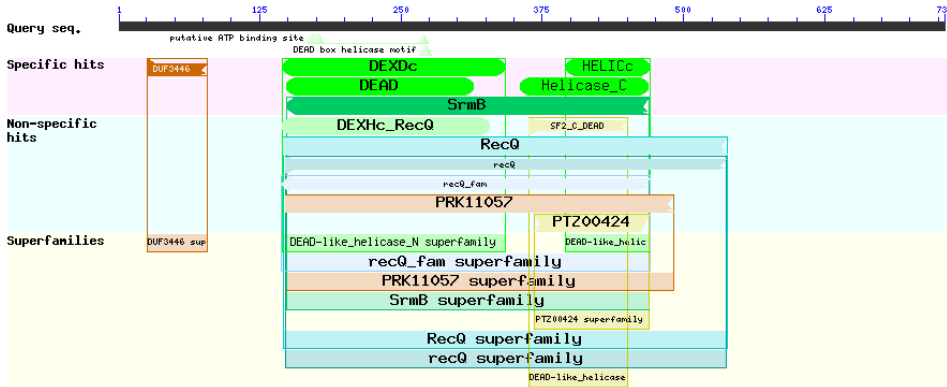
RecQ Helicase MP16544



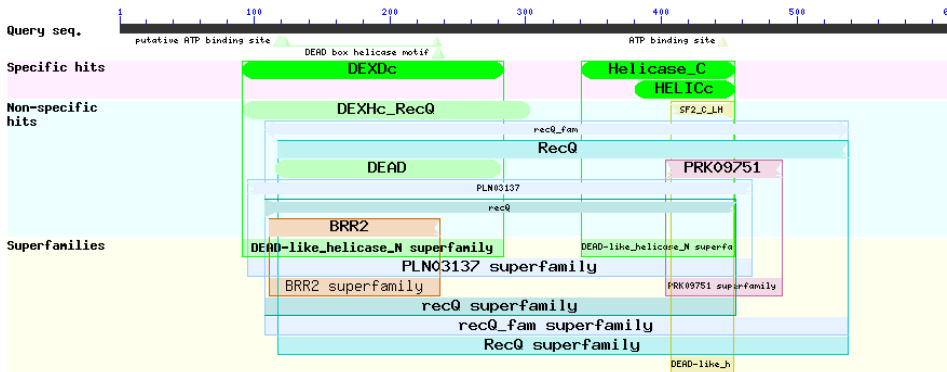
RecQ Helicase MP03701



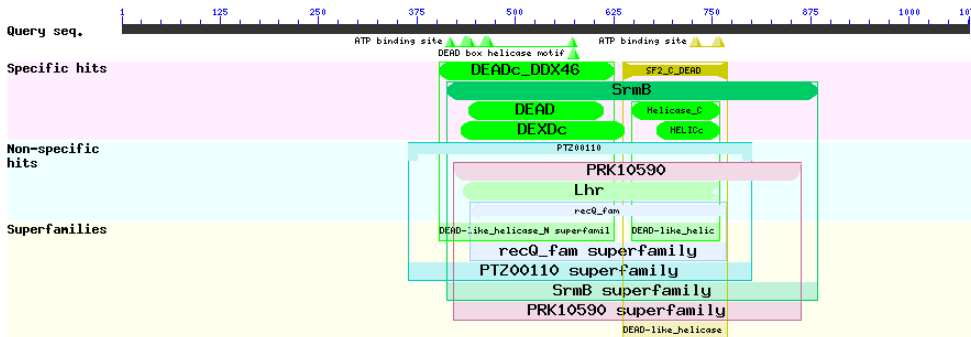
RecQ Helicase MP16505



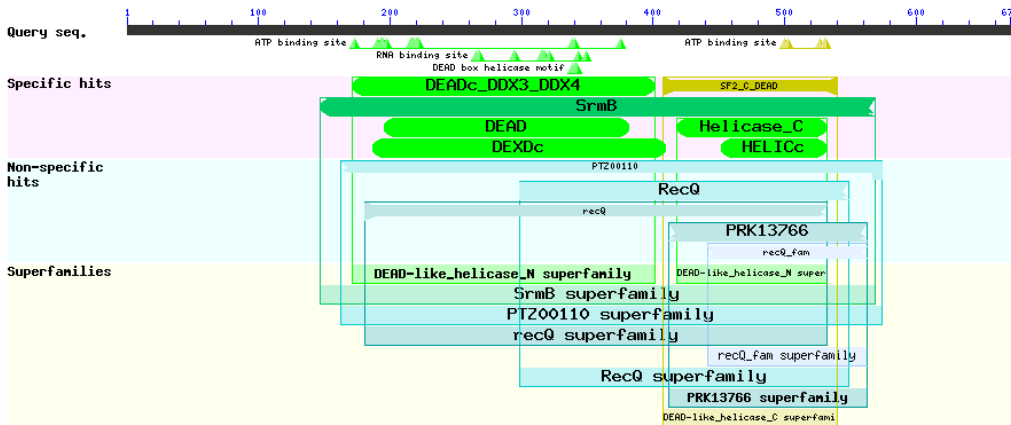
RecQ Helicase MP16430



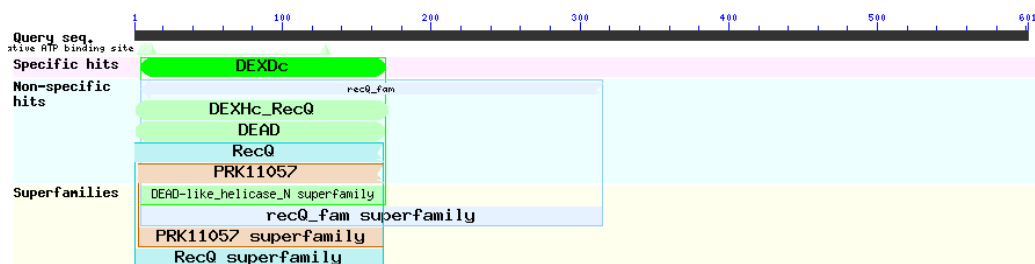
RecQ Helicase MP04710



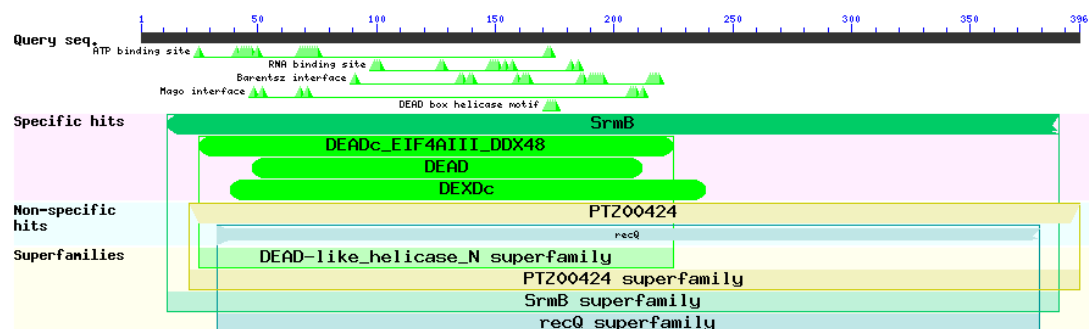
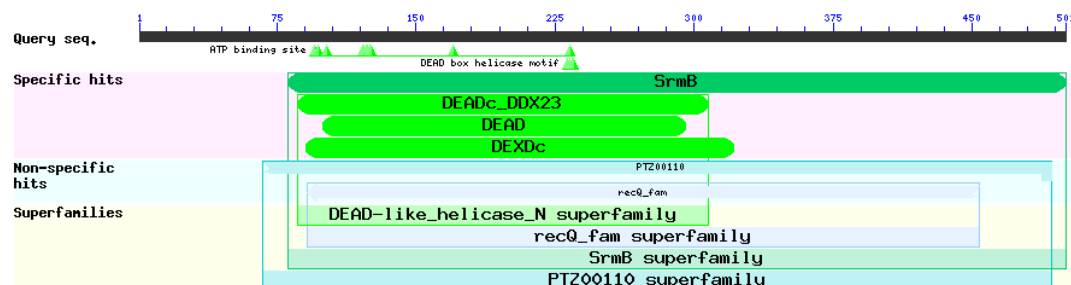
RecQ Helicase MP01830



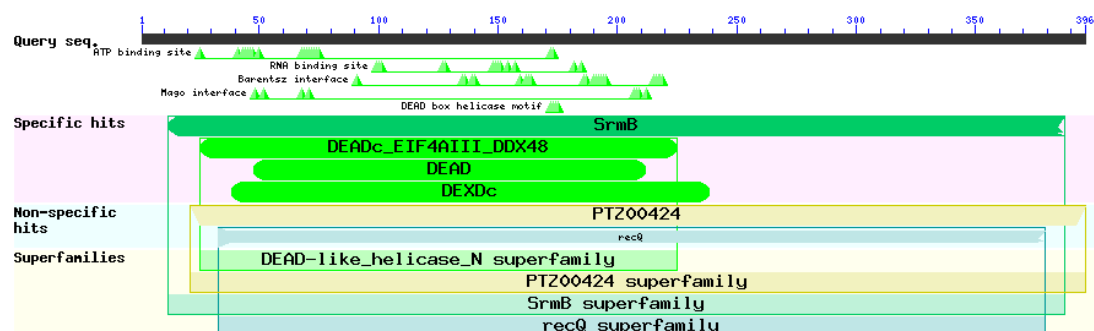
RecQ Helicase MP12150



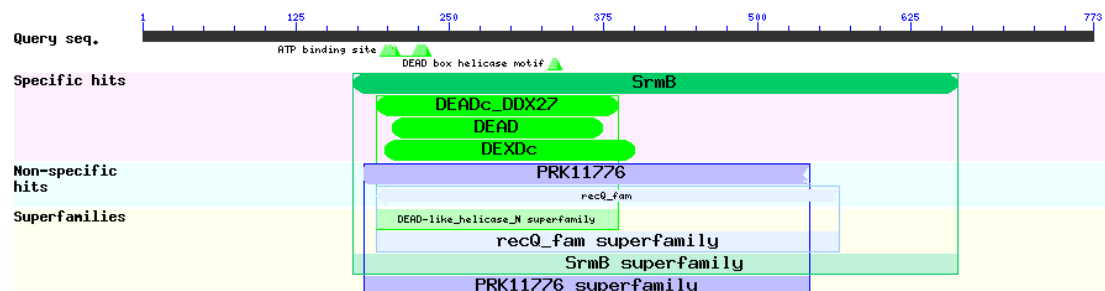
RecQ Helicase MP12680



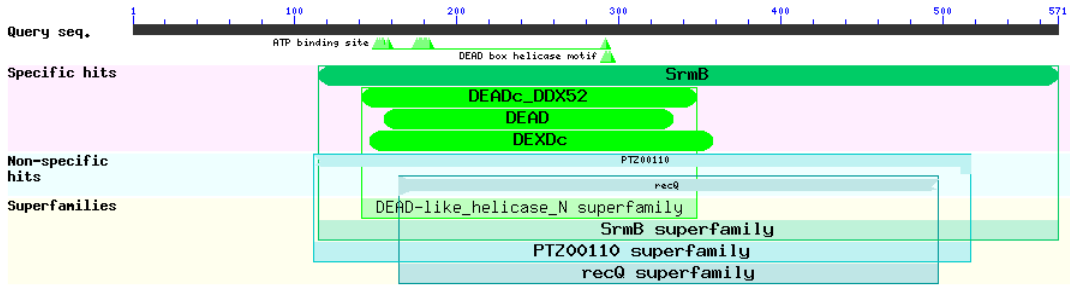
RecQ Helicase MP00233



RecQ Helicase MP02642



RecQ Helicase MP04844

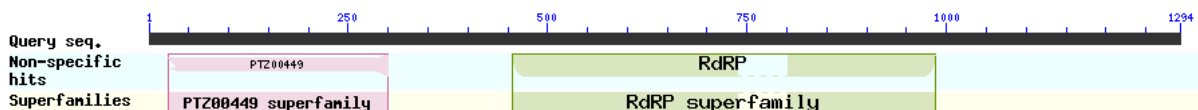


RecQ Helicase MP07090

Anexo E. Domínios proteicos conservados das RdRP (QDE-1) de *N. crassa* e candidatas de *M. pernicioso*.



RdRP QDE-1 *N. crassa*



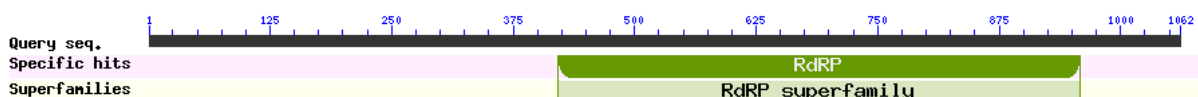
RdRP MP02213



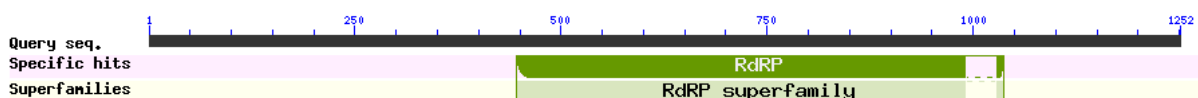
RdRP MP08656



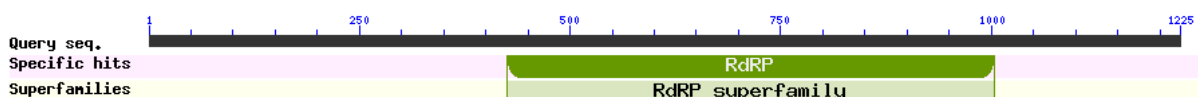
RdRP MP02297



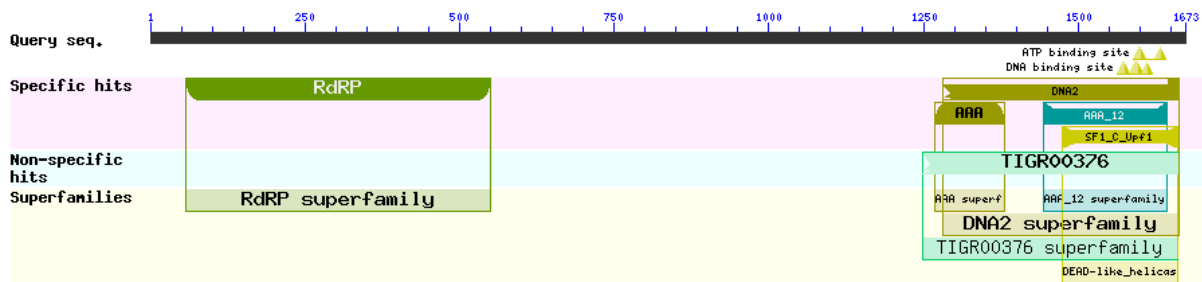
RdRP MP09882



RdRP MP10417

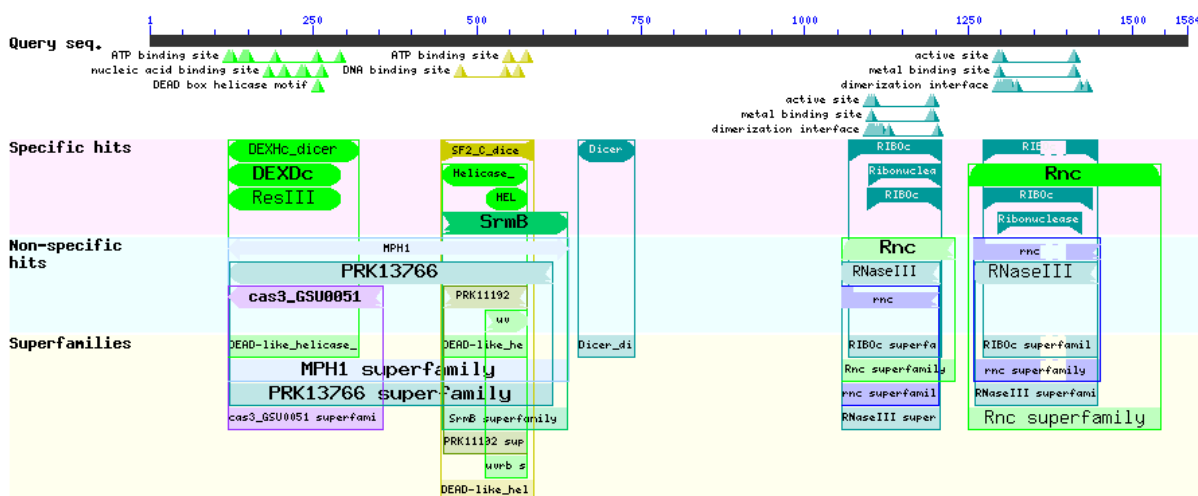


RdRP MP11137

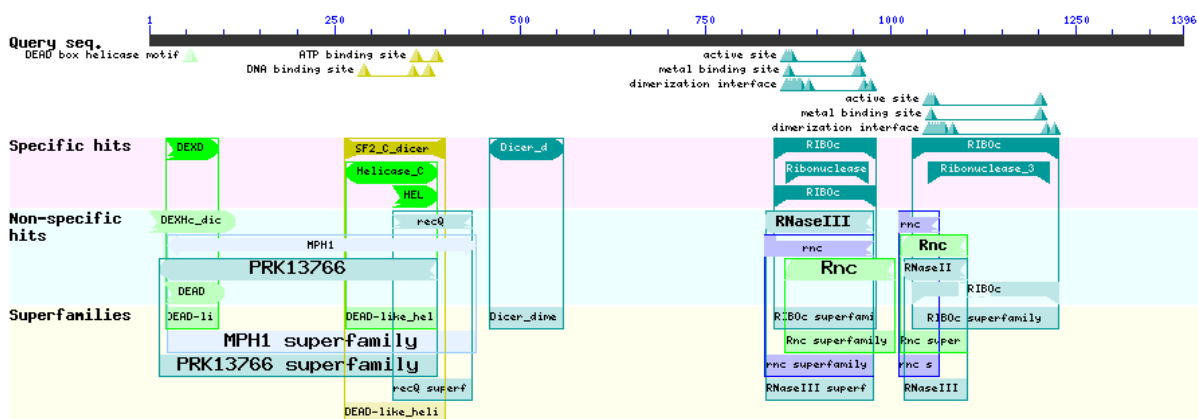


RdRP MP15899

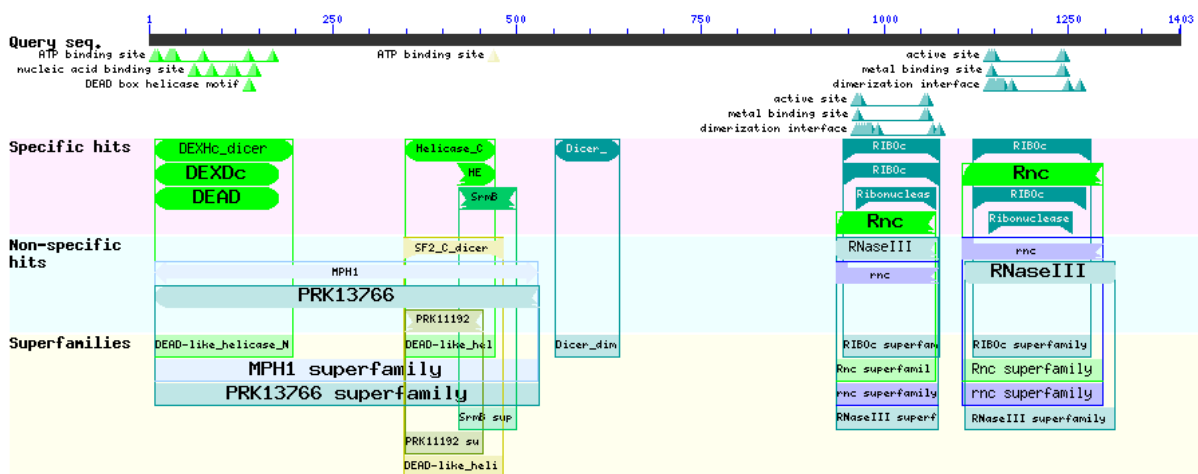
Anexo F. Domínios proteicos das *Dicers* (DCL-1 e DCL-2) de *N. crassa* e candidatas de *M. pernicioso*.



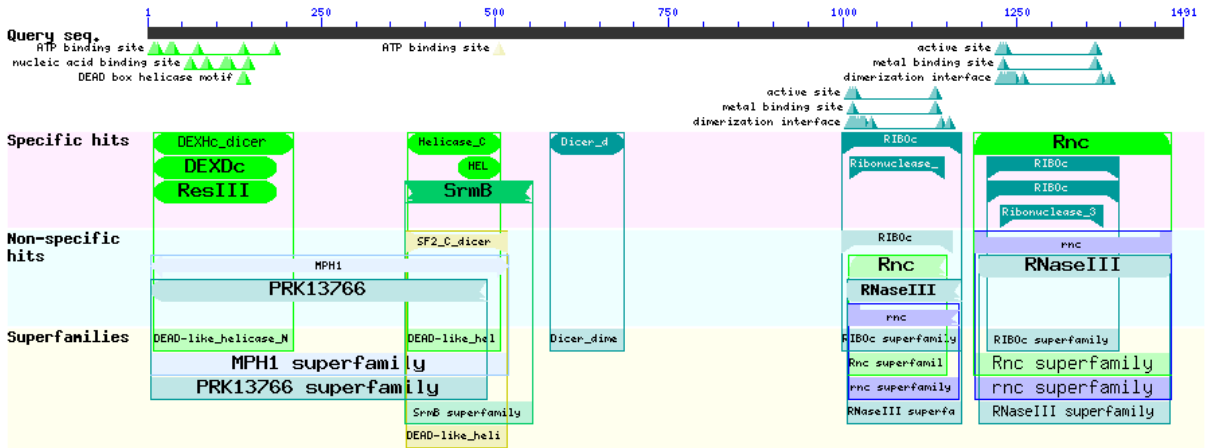
DCL-1 *N. crassa*



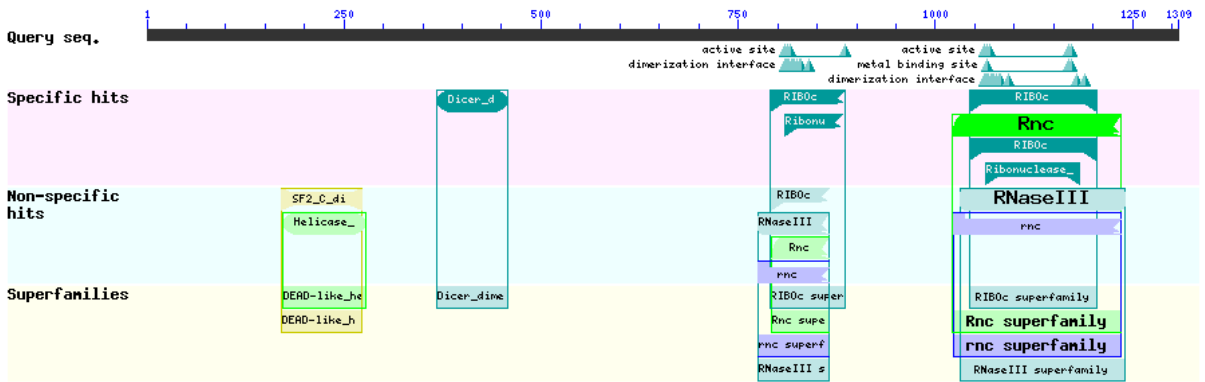
DCL-2 *N. crassa*



Dicer MP14055

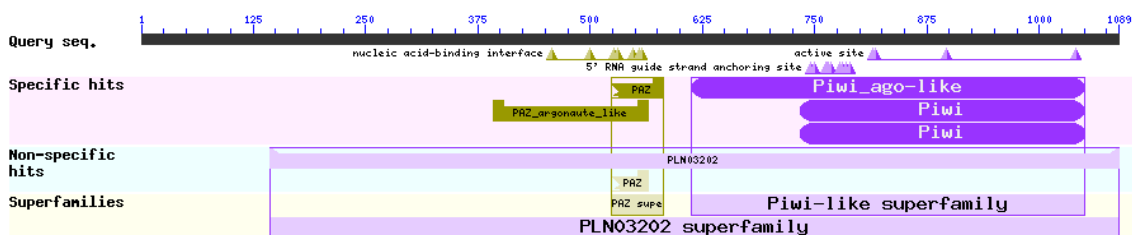


Dicer MP10442

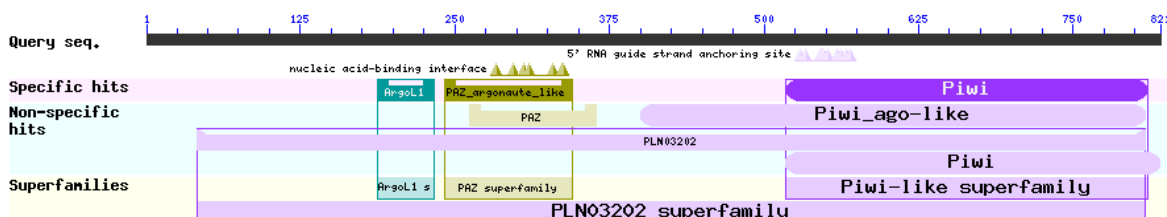


Dicer MP01869

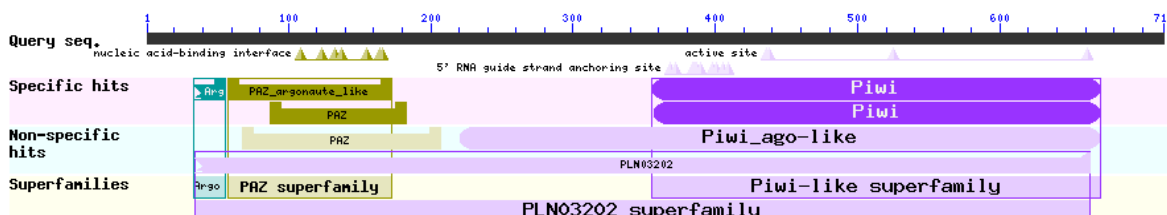
Anexo G. Domínios proteicos da Argonata (QDE-2) de *N. crassa* e candidatas de *M. perniciososa*.



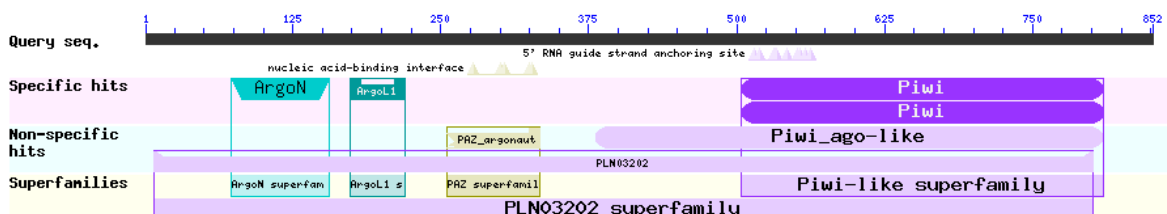
QDE-2 *N. crassa*



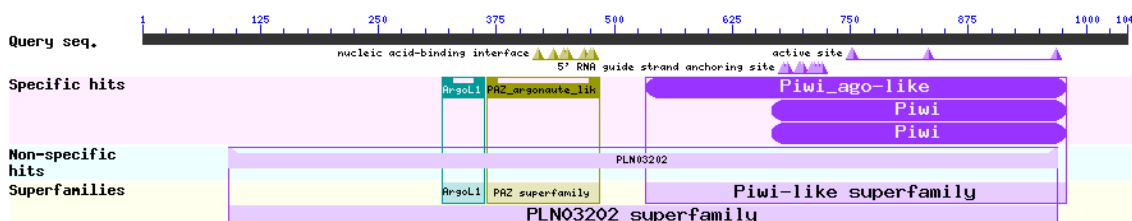
Argonata MP03238



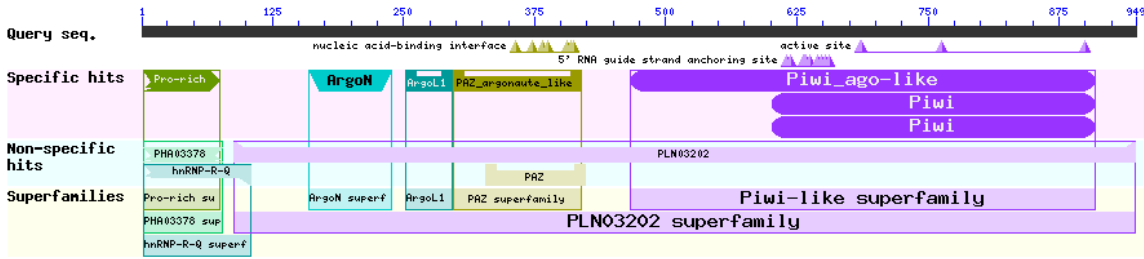
Argonata MP03267



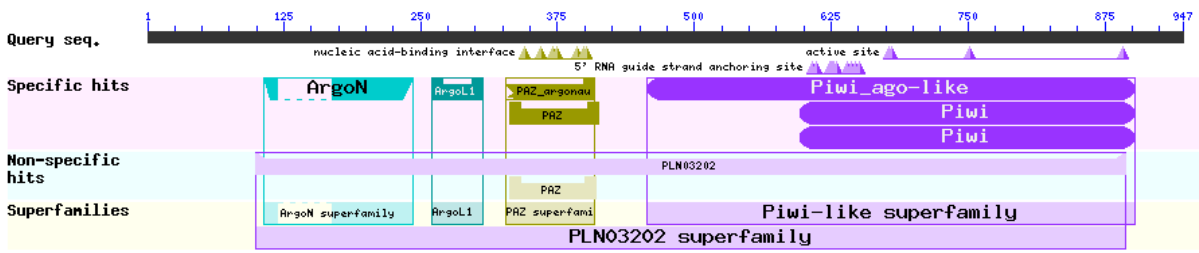
Argonata MP03288



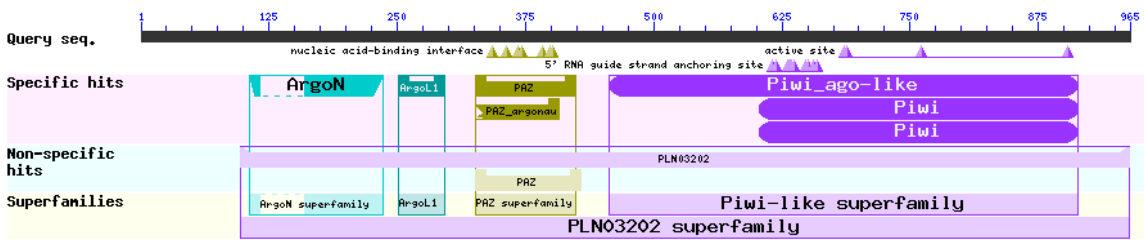
Argonata MP07032



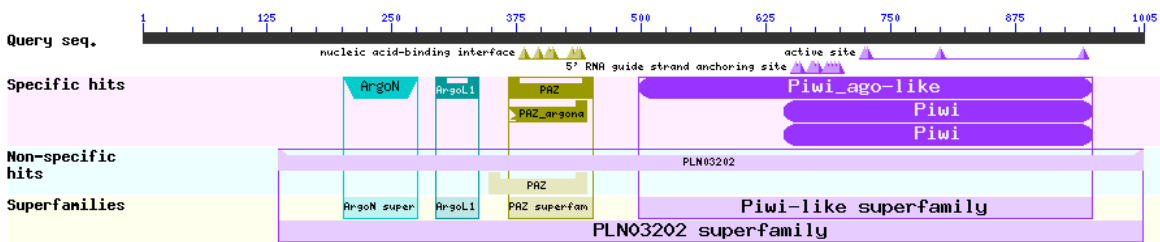
Argonauta MP08202



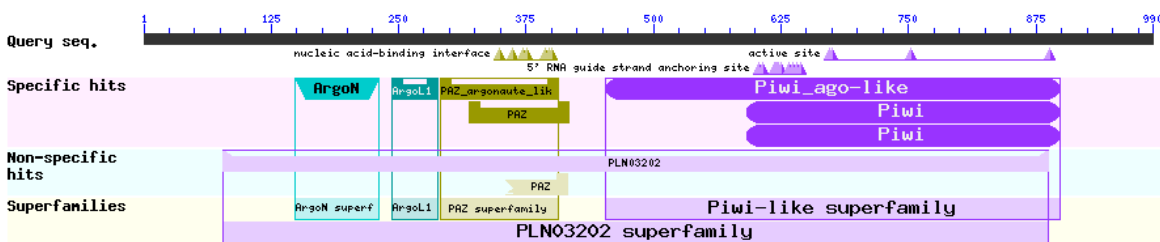
Argonauta MP08788



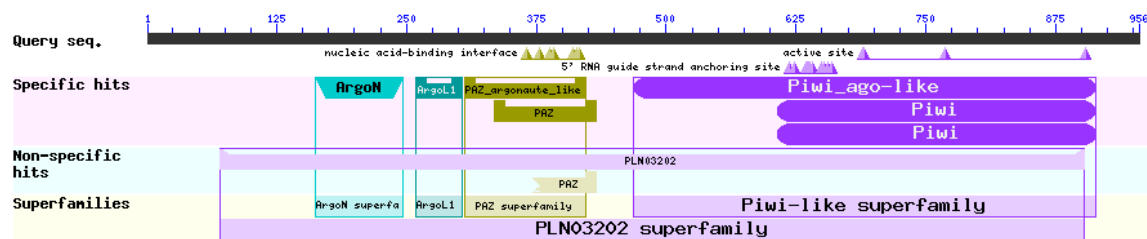
Argonauta MP08974



Argonauta MP10832

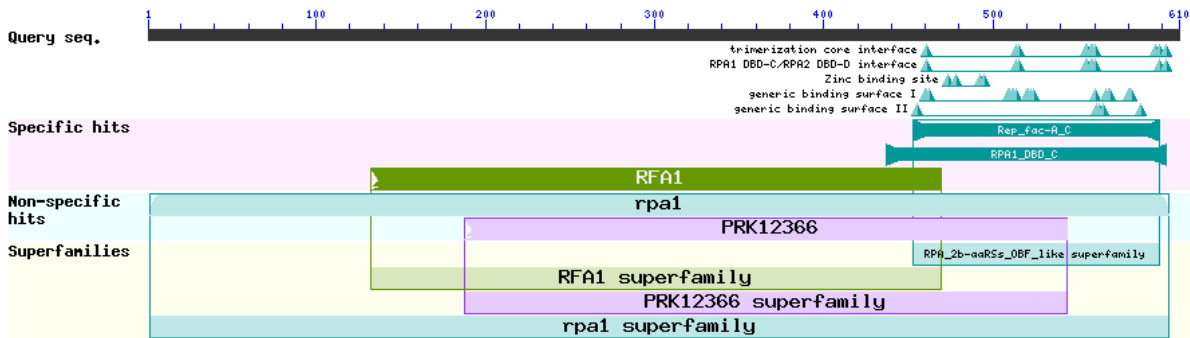


Argonauta MP13872

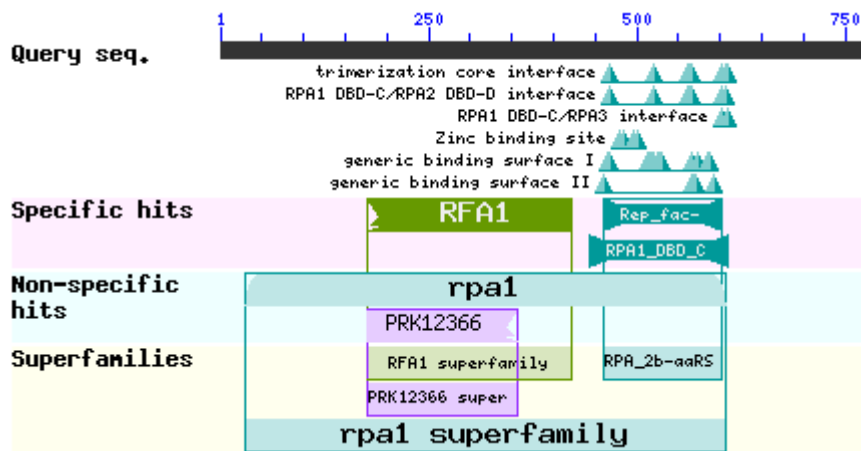


Argonata MP13876

Anexo H. Domínios proteicos da RPA-1 de *N. crassa* e candidatas de *M. pernicioso*.



Domínios proteicos de RPA-1 de *N. crassa*



Domínios proteicos de MP02314 RPA-1 de *M. pernicioso*

Anexo I. BLASTp dos genes de *N. crassa* com os candidatos a homólogos de *M. perniciosus*.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E-Value
Recq helicase QDE-3		
MP00763 >MP00763	416	3e-123
MP14995 >MP14995	322	8e-92
MP01699 >MP01699	305	3e-87
MP07550 >MP07550	223	8e-62
MP15420 >MP15420	147	2e-36
MP13589 >MP13589	125	2e-29
MP09541 >MP09541	123	3e-28
MP12489 >MP12489	119	5e-27
MP06392 >MP06392	115	1e-25
MP14167 >MP14167	100	3e-21
MP16544 >MP16544	79.7	6e-15
MP03701 >MP03701	71.6	2e-12
MP16505 >MP16505	70.9	4e-12
MP16430 >MP16430	65.1	3e-10
MP00762 >MP00762	62.8	1e-09
MP14297 >MP14297	62.0	2e-09
MP04710 >MP04710	60.8	5e-09
MP01830 >MP01830	56.6	1e-07
MP12150 >MP12150	55.5	2e-07
MP15037 >MP15037	53.5	8e-07
MP12680 >MP12680	53.5	8e-07
MP00233 >MP00233	51.2	3e-06
MP02642 >MP02642	48.5	2e-05
MP04844 >MP04844	46.2	2e-04
MP07090 >MP07090	45.8	2e-04

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E-Value
RPA-1		
MP02314 >MP02314	473	2e-148
MP11091 >MP11091	157	2e-43

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E-Value
Rdrp QDE-1		
MP02213 >MP02213	138	7e-33
MP08656 >MP08656	114	1e-25
MP00604 >MP00604	100	2e-21
MP15899 >MP15899	72.0	1e-12
MP10417 >MP10417	64.3	3e-10
MP09882 >MP09882	53.9	4e-07
MP11137 >MP11137	50.8	4e-06
MP02297 >MP02297	43.9	4e-04

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E-Value
DCL-1		
MP14055 >MP14055	211	3e-55
MP10442 >MP10442	178	5e-45
MP01869 >MP01869	130	3e-30
MP02453 >MP02453	61.2	3e-09

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E-Value
DCL-2		
MP10442 >MP10442	237	2e-63
MP14055 >MP14055	97.8	2e-20
MP12150 >MP12150	62.8	7e-10
MP02453 >MP02453	62.8	8e-10
MP01869 >MP01869	62.8	8e-10
MP00236 >MP00236	49.7	5e-06
MP00233 >MP00233	49.3	7e-06
MP14297 >MP14297	47.0	5e-05
MP02642 >MP02642	45.8	7e-05
MP04844 >MP04844	44.3	4e-04
MP03345 >MP03345	43.1	6e-04

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E-Value
QIP		
MP00590 >MP00590	86.7	3e-18
MP03252 >MP03252	48.9	3e-06

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E-Value
AGO QDE-2		
MP08788 >MP08788	321	2e-93
MP10832 >MP10832	319	3e-92
MP08974 >MP08974	298	2e-85
MP08202 >MP08202	230	1e-62
MP13872 >MP13872	228	1e-61
MP13876 >MP13876	226	2e-61
MP03288 >MP03288	193	7e-51
MP07032 >MP07032	192	5e-50
MP03267 >MP03267	172	2e-44
MP03238 >MP03238	137	4e-33
MP12999 >MP12999	83.2	3e-16

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E-Value
RdRP-2 (Pb)		
MP09882 >MP09882	273	4e-76
MP10417 >MP10417	241	4e-65
MP02297 >MP02297	237	9e-64

MP11137	>MP11137	226	4e-60
MP15899	>MP15899	223	4e-59
MP00604	>MP00604	88.2	9e-18
MP02213	>MP02213	88.6	1e-17
MP08656	>MP08656	85.1	1e-16

Anexo J. Alinhamentos múltiplos globais dos genes de *N. crassa* com os candidatos a homólogos da mesma classe de *M. pernicioso*.

RecQ Helicase

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.427)

```

NC_QDE-3   MAEREREGTSSS-----SSSS-TSRGTS-----RGTTPLSLSPPPQEQEQE
MP07550    MD-----
MP01699    MS-----L-----
MP00763    MS-----GTPRN-----
MP14995    MR-----
MP12489    MS-----
MP06392    MENLEDLNISPSQFILGLISHSELLESKSSITNLSHILDALKSNPATKTAIDWAE--
MP09541    MG-----
MP13589    MA-----
MP15420    MT-----
MP14167    MS-----
MP16505    MN-----PQLPLL-----
MP11895    MS-----
MP12680    -----
MP12680    -----
MP16430    MA-----
MP16519    MA-----
MP00762    MS-----
MP12150    MT-----
MP01830    MGRRD-----RSYSPDTSN-----
MP02642    MS-----
MP00233    MF-----
MP14297    MT-----
MP04844    MV-----
MP07090    ME-----AFQLSRGGIKF-----
MP16544    MS-----
MP03701    ME-----
MP04710    MT-----
MP04057    MQ-----

NC_QDE-3   QQQQQQQQQEQQNTSDTRSNQLSSSLRTFTTSATSATSSSVQQNTSNHQVLLPLPSTSS
MP07550    -----
MP01699    -----
MP00763    -----NLDALLSRTKSNNVSSSI-----
MP14995    -----
MP12489    -----QHSHVTA-----
MP06392    -----HQFTTSLMEEIKQLTHISSGLHFESTHATREKLEEINMET-----LTLRMQKY
MP09541    -----
MP13589    -----
MP15420    -----
MP14167    -----
MP16505    -----QSRELAA-----
MP11895    -----
MP12680    -----
MP12680    -----
MP16430    -----
MP16519    -----
MP00762    -----
MP12150    -----
MP01830    -----KRVRHSHRSS---RSPSPTRR-----
MP02642    -----
MP00233    -----
MP14297    -----
MP04844    -----
MP07090    -----
MP16544    -----

```


MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 SPSTSTSFSSSLSSWVPHSLKVLHFTAGSVTAAAS-----
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----
 MP14995 -----
 MP12489 -----
 MP06392 APRT-----YHLLGNLLAADEAHLRERERQRQYWLRKKGKNQETV
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 APRPNNR-----SRYDDRE-WDR-----D
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----D
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 TSSSSNSGGDTVLPNASGGVLGRLLTSSTAQSTLMTRNNWGEQV-----SWLKRS
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -SAPISSKKGPKF-----
 MP14995 -----
 MP12489 -----
 MP06392 TTEEESEEAKDIFND-----RMDEWEEEVDEETHEKNEQSRRQ
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 RDRDRRDRDRDRYRDERHKDD-----RRRDYRDDRDRRDRRDRRDRR
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 YVMTIDSDEDEVFSPR-----
 MP07090 -----DKNRFNKD-----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 GN-----SIVVPQGP-----VYPSAAASIQTTPSTTTTTTPSAIED
 MP07550 -----

MP01699 -----
 MP00763 -----KP-----STVAPSSSGSTVLYSSSR-
 MP14995 -----
 MP12489 -----
 MP06392 ANVHIKQVMCLSIIMQSTNRNCNALQALIGLYLHSCGASDSVTEVVSHIGVVISITSIRR
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----MMASIP-
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 DRRDDRR-----DDRRRSRSRERRPTQASSPP-
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----IALASID-
 MP04057 -----

NC_QDE-3 -----GYSSTSSFPRDN-NLFPLYSTPAVTNPQVSGSESLGGAGRGT--
 MP07550 -----
 MP01699 -----YSTPNS-----
 MP00763 -----KISGPLPSFSTPGFGQS-----
 MP14995 -----
 MP12489 -----RTRRGTPQTRPQ-----
 MP06392 MIHNLSITHADDLKLGRSLLEGIGFDNVDIDTKHESSRLEDPTSTLVH-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----NESTSLTQPNV-----
 MP14167 -----TSTPSIPLS-----
 MP16505 -----STHSTNTINTPATPLY-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----RAQATPEAVATPTPPPPEDEATKARRAKYE
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----KSAITEDAHLNPEF-----
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----DAHNTHSFSTTMH-----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 --GRGRGGGRVGGGGPVQQQQPPPLGPPPPPLPPPPPPPPPPQOPTQQRTQQPTPNPTSTS
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----KPSASVTPI-----
 MP14995 -----
 MP12489 -----
 MP06392 -----LTSGTAIPLQ-----
 MP09541 -----

MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----PL-----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----FNGYS---
 MP12150 -----NALVNGNG-SA
 MP01830 AWKKGREAKKALGEAKAKAMALAGKSAPAPPAE-----APTKPTGQLNRAALNGLG-LK
 MP02642 -----
 MP00233 -----GRGHLA
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----LQLFDGTSKKS
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 TSTSTLATSRYTNTSSTNDARP-ATRQQIAPEVGASTHQDSVGLGEGGGGGMAKLSVKNN
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----SASRLTDSTSSDSPCPGPSRKR-----SSDASCL-----
 MP14995 -----LSDSYDADD-----YMGSD-----
 MP12489 -----DIIELSDSED-----DS-----
 MP06392 -----HGVTRSDLSCSDELAEEATR KETT--L
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----G-----
 MP14167 -----ITRTNS-----
 MP16505 -----KENNT-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----DSS--EG-----S
 MP00762 -----
 MP12150 GIEGKFESLNLSKSAYV-----
 MP01830 GLPLK-----
 MP02642 -----
 MP00233 GI-----DLAHDLST-----
 MP14297 -----VAITKEDNGNV-----
 MP04844 -----TFDLSGDPYTD-----L
 MP07090 QVKWE-----TVDVSQDSAL-----
 MP16544 -----
 MP03701 -----IADSM-----
 MP04710 -----ESD-----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 LPRPHLVSLSSSTTGSGSGSASRSASAKHGSAGSSTFDHEQHQQHQQQQQKQRQRSQSEA
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 ---PDLHD-----
 MP14995 ---PELAEVME-----RSR-----
 MP12489 ---PQLVK-----
 MP06392 FADPEIIHALAKEFPDSSCS-----KLTRRQRFIR--
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 LD-P-----
 MP14167 --LPINIE-----
 MP16505 ---PGRLINVS-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----

MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 ---P-----
 MP00762 -----NG-----
 MP12150 ---PPHLR-----
 MP01830 ---PEFTKSMTASMDDS-----VETKR-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 LEGPSTLP-----
 MP07090 ---PAELDFFK-----
 MP16544 -----
 MP03701 MSEP-----
 MP04710 -----
 MP04057 ---P-----

NC_QDE-3 RQQQQQQQQQQQQQQQQQQQAQHHAHSTYAQRQPQTPQQRPPQNLTPASTTGASVGPLQR
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----
 MP14995 -----QDYGH-----
 MP12489 -----
 MP06392 -----WKFLQDLIALVP-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----HAH-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----YAQ-----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 AYSVSLAARQSPSTNLVRPKTDSAPHTLHLKKNKKNLRHPAPTDPSPIVD---DDIFSD
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 ---TAKKCRTPSPD-----
 MP14995 -----
 MP12489 -----RKPSPIPES-----
 MP06392 GFSDYRKYVKDPEDVLKIPLTKSEQLH-----ARMMDVPCTKASECDQVLED
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----TPPHS-----
 MP16505 ---VQLFTPPAT-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 ---NAQRAASSPNL-----
 MP01830 ---KLEKLGDMPAIDMT-----

MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 ---DLEKKKGKSKN-----
 MP04844 ---DSVTKGKPEP-----
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----PRA-----

NC_QDE-3 AVDLTEELDHDHDLNGKDKDNTDNDNTVASSSLIGFGDDKLLWREDFAERAPEPEHERGGS
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----DKENQSF-----RATHSNIADKHKAS--
 MP14995 -----
 MP12489 -----GHSQRKRSK-----
 MP06392 ---IIRHQLNIGDPYDHKEKNKEGLTDIGNMVMLVFGDLG-VGQQLESLLSRRVEDTPW
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----GADKRAAEY-----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----SNGNGWVDSRSSTPS-----RFESRGGSSDRGGR---
 MP01830 ---MNEGEASVGDLEVDDDDDEEAN-----RMDQAMRKKKSSDDAM--
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 ----KVKDSASEVEVEQKKKSKK-----RKHEEIESQQNAEA---
 MP04844 -----ISVDDIVARRKSSKRK-----RETEEESSEEDVEE---
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 RPRQVKKRKISNDYIMKDEDVSLFDDDGEEDEFMDINELVQGDRESTPKPKATSRVSTR
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----
 MP14995 -----
 MP12489 -----
 MP06392 RRRQFVV----FVMGLFHVKM---ACADALWRIYLKSGSDTED-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----GGHRNGYSG-----
 MP12150 -----GTPNAFSNPRGGSSNGYSN-----
 MP01830 -----DVDEDDVDPLDAFMSGVKEQ-----
 MP02642 -----GLNAGDEK-----
 MP00233 -----
 MP14297 -----GTEAGEEA-----
 MP04844 -----ESENSF----GESDQDEF-----
 MP07090 -----GGAPGKRKA-----
 MP16544 -----

MP03701 ---|-----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 LPP-TVSLQRGRSPKRKEASVEKRTTENQQQADREDEPSFMSSPDVDNSRKRKSSGSPTG
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -PV-ISSLATGKSPTKKK-----
 MP14995 -----
 MP12489 -----ISPSNVS-----HGPNVSAHG-----
 MP06392 -PLCLEKLVQQIRPLETKRI-----KSNPGFRRMHEV----IQWVGAVER
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----PTKTF-----NVPS-----
 MP16505 -----PSPTS-----NQPALSTS-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----GAGGGGY--
 MP12150 -----GRNFSRDDSSS-----GGG--
 MP01830 -----VQKVNLEDLKK-----LGNL--
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----SGKKKKKKKNKRS-----
 MP04844 -----GGIQPSDDEED-----EEDPL-----
 MP07090 -----DGKMKGSPGKRR-----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 LTTTPRQQKQTEEVPGTTTAKKPRRSEVMDSEDEAFTPLSAGSLPGSAEFFRSGGTTTRE
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----DKGKAKAQPEDDND-----
 MP14995 -----
 MP12489 -----STVTADLDSIKGKL-----
 MP06392 LNCWRIMVQK--HTPYQTLEDFAAKPSYDVLEKLABRLSLEYV-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----GGGYGGGGWNDKMGNLGGG-----
 MP12150 -----GGAMYGYGVWRD-----
 MP01830 -----SGRQRLEGADEDFGV-DDAIPDELDTDLN-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----QDHLADTRERR-----
 MP14297 -----HDAKKADEDVDMQAIIE-EDEKRDKKDKKKK-----
 MP04844 -----ATSGEEVDEAENEQEQE-----
 MP07090 -----RLEKGDSEENSDEDD-----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 LGLDEDTVMDTPSRPPVESTLPTLESVESRPPPLPPMDLPSQRKPLEPLNTPRNQLLESV

MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----RPWMMELP-----GEDVNPFTKLKTD-----
 MP14995 -----
 MP12489 -----
 MP06392 -----CDIGRDIESIRPLGEE-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----TP-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----PEDILALAAKKAKK-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 ERPTQQPSVGPSFAQSSTLAESSLPSPMPPSEDPLNTRENSNLEEFDYKLYKPLLDLFV
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----
 MP14995 -----
 MP12489 -----
 MP06392 -----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 NAPAILERELSAVNDELQENMIKLRDCLRLPREERDRAREEVKKEKEMLKRRDIALRALQ
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----
 MP14995 -----
 MP12489 -----
 MP06392 -----DKSRD-----

MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----LKAV-----DWSR-----
 MP12150 -----
 MP01830 -----KELAAV-----DHSR-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----DKK-----
 MP04844 -----
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 DEHKLYVKKRKEHNLINEEIVRAYAEEDDEYEDQLMAQLDKLDDEVEAIVKSLTRLIVAA
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----FARYNN-----DP
 MP14995 -----
 MP12489 -----A
 MP06392 -----LTF
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----H
 MP14167 -----NTF
 MP16505 -----AS
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----QKL
 MP12150 -----GRH
 MP01830 -----VKY
 MP02642 -----
 MP00233 -----KAL
 MP14297 -----DKK
 MP04844 -----DEE
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 GITEKSFDLKK-----EEEEEEKPIIIATPTPSTRTEAPVL-----
 MP07550 -----
 MP01699 -----DDSQFAATPTPEL-----
 MP00763 SSESRDNDLDEFSSDHLKGILGFNEDLKSSYEALGACDSPNV-----
 MP14995 -----QSHSYQSTSGSTLDSRA-----
 MP12489 FNYQKNAETST-----YLSRYAGGDKNI-----
 MP06392 ENSLRRQQLFLL-----YEEITWAMNEGDIGRVEECFVPMWIFRATG
 MP09541 --SQRHS-----
 MP13589 --TQRHS-----
 MP15420 RVYARSYRLL-----NEARSNAAKTRKYR-----
 MP14167 ETPRRRKKPSS-----
 MP16505 SNPEQTKKL-----HRGKYQATPRP-----
 MP11895 -----

MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 PHFEKNFYL-----EDKRVARSARDREIE-----DFRRS-
 MP12150 IIGQRNMRI-----EKEIYGDASDPSKQHTG-----INFEKY-
 MP01830 EPFRKEFYI-----PPPDIVAMTDEEAE-----LLRLE-
 MP02642 -----LVFESS-
 MP00233 KTGIDERHW-----TEKPLNEMRERDWR-----IFRED-
 MP14297 DKKKKHSETTT-----AESSKAASPSRSTAPKAS--PSEVSKFLAK-
 MP04844 DDGSSSSEE-----SEEETQAEKDRKAA-----FFDSE-
 MP07090 -----AEGPLDDAPESHIP-----
 MP16544 -----
 MP03701 -VTQRRQ-----LLQALTSLKLEDLCRLAI-----
 MP04710 --QKAIETLTI-----QVQSVMKMSAAQLKEVVV-----
 MP04057 -----IFE---

NC_QDE-3 -----PTTEYHN-SQQVILQTQHPA-----
 MP07550 -----
 MP01699 -----GYTDPR-----
 MP00763 -----DPVTVKGI-----
 MP14995 -----TSSTLHSQCQPQGFGSGHPS-----
 MP12489 -----DPVSLEKM-----
 MP06392 KHRYAKFLQRYLRDMHFTYARFPRRLRAIRFH-----ILVNPTGKKGKWRGVVDWVIE
 MP09541 -----MPE-----
 MP13589 -----MPE-----
 MP15420 -----
 MP14167 -----C---RPPATEPK-----
 MP16505 -----PSYTPYAVKSH-----G
 MP11895 -----SNPT-----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----RGLSSPE-----
 MP00762 -----KEIRVQ-----GRGVPR-----
 MP12150 -----DDIPVEA-----TGAGVPD-----
 MP01830 -----LDSIKIR-----GVDCPR-----
 MP02642 -----EAVSV-----
 MP00233 -----FSISAR-----GGQIPH-----
 MP14297 -----NNVSIH-----VSPGQPE-----
 MP04844 -----TTTNIH-----
 MP07090 -----KHRITAK-----GRNVPE-----
 MP16544 -----
 MP03701 -----DHISAN-----ENPV-----
 MP04710 -----RRNIIN-----APD-----
 MP04057 -----WLNANYPK-----

NC_QDE-3 -----AQQVSHRVPPTPSFQ-----TARQTPVSYQS--RPTNNSFPDISAE
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -IDILNERIAAIRDALNSRAPSQGSSE-----AMVTSPYFFP-----NPAASISSD
 MP14995 -----YAR--M-----
 MP12489 -KSFIDNRVYAVKTQMLINATTMSC-----H--ETTPPKV-----
 MP06392 LNNFYIKRIYGGKFSNHTKKRIIEESALIGVYKNARKQVEWMFQRTHQTRHTIRD LKGS
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----YAR-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----

MP01830 -----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 EAMMFDKEDPFMEQQHAPASAPFQATLPQRNSPFKT--APFKPVHGHDYFDEDDDDADLL
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 TLM-----SSMDHIQTSSDAPMDVIDIQDDIEVEPAREPTSDDQYWGEFDDIDFEAEDM
 MP14995 -----MELQENVNKLETEIGDIDREIRT-----LQATKTFC-----
 MP12489 -----QPTQ-ATIIQSYP-----
 MP06392 ----FKKLSRYLQDHKANDFIEGRSGIKVEDVLD-----IGAAMAFDNLSK-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----WPRL-----
 MP16505 -----REVYAFG-----
 MP11895 -----WT-----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----SFR-----
 MP16519 -----
 MP00762 -----PVTSFE-----
 MP12150 -----PVTSFT-----
 MP01830 -----PVTKWS-----
 MP02642 -----VSTFD-----
 MP00233 -----PLRSWV-----
 MP14297 -----VTPILAFD-----
 MP04844 -----DSFV-----
 MP07090 -----HAETFEALRD-----
 MP16544 -----
 MP03701 -----PW--PYIDTLS-----
 MP04710 -----YPS--HYLLTLQD-----
 MP04057 -----PRI-----

NC_QDE-3 AAVDSAETYTSTAATTTNNNNHLRSQSVMSSTATTIKPRKRNNENANAKKAKSVHAKLS
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 DALD-----QSIVDPSPPRPLPP-----DSALS-----
 MP14995 -----QENLQKAKAELD----TLKYGKGKGGKANANGAPS----G
 MP12489 -----PKRID-----
 MP06392 -----GHESEEGDGEVLESDFEPLSPPKETQYQ-----S
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----PRRVP-----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----N-----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----

MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 MPPEKMKYAWSNDVRKALKDRFRMSGFR-----QNQLEAINATL-----GGKD
 MP07550 -----NAHKVLKEIFGFESFR-----LSQEAVIHRL-----VENEN
 MP01699 -----IEACHRTLRETFGHSSYK-----GKQKEIVEAAV-----LGQD
 MP00763 -HLQHAHNPFYPEIMKTLREVFRQLQTFR-----RNQLEAILAAM-----AGKD
 MP14995 INYDVDSFVWMGGLKSKMKEVFGIPSF-----LCQRGVCNANM-----DGRD
 MP12489 -----EQMIKVRLEVFGLTSPQ-----KGVKAILQIL-----QGHR
 MP06392 RFKKKGEPWTEELVRQVVKERFGMRPCL-----SQIQPALDIY-----QGYD
 MP09541 --K-----DEDAQGVVRNRFICPCI-----WQLRVVRSIL-----EGKD
 MP13589 --K-----DEVAQDAVRNRIGVCPIC-----WQLRVVRSIL-----EGND
 MP15420 -----SEDRSILTRGFEEQFTKPPYS-----WQLDVAEAIL-----LGLD
 MP14167 -----ESDIVEVTEKMFYKPHS-----WQVQIVMKIL-----EGNN
 MP16505 -----DTIVLPRLLTTLVEQWNSIAHEKHLLPHHLKLRPHQIECANHIL-----EREKD
 MP11895 -----DSAGRNTLKLVERRIKHWPNG-----LCKHQLEHILAIL-----DGNR
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----SVEGLKALDDIVKTRIPQWSNG-----LRQFQRESISTIL-----DQVD
 MP16519 -----LTAVRRLIRHRFPDHLHD-----YAIEAICRAA-----DGFH
 MP00762 -----EAAFPEYIMATIRAQGFSAPTP-----IQCQAWPMAL-----SGRD
 MP12150 -----SPPLDPVLENIGYARYTTPT-----VQKYSIPIVA-----NGRD
 MP01830 -----HFGLPASCLEVIKLNNTAPTS-----IQAQAVPAM-----SGRD
 MP02642 -----DLGLKEDLLRGIYAYNFEKPSA-----IQQRAILPIT-----QGRD
 MP00233 -----ESSIPPQILECIEKIGYKEPSP-----IQRQAIPIGL-----MKRD
 MP14297 -----QLDIPDSLRSF--SAKFKEPSP-----IQTCTWPPSL-----NGKD
 MP04844 -----TMNLSRPILKALTTMGFNKPTP-----IQAATIPMAL-----LGKD
 MP07090 -----RYHISSHIMANLSKNGYLHPTG-----IQSYGAAIL-----ESRD
 MP16544 -----
 MP03701 --PNHQSLALTMCLACWFCTQKKQVPRE-----IQLKAAISVLSTSPQRDYRD
 MP04710 ---NDLSLALKAIIGYLITDGRETPRE-----LQVHAVRMSY-----GTD
 MP04057 -----DPEWLQGCYDWVTSEKNLDPPT---DIDQIHEIELQLLESDLRDS-MLHGTG

NC_QDE-3 A-FVLMPTGGGKSLCYQLPAVVRSG-----KTRGITVVISPL
 MP07550 A-VVVVFTGGGKSLTFQVPALCLD-----GLTLVISPL
 MP01699 V-FVLAPTGMGKSLCFQIPAASAEA-----GITIVVSPL
 MP00763 V-FVLMPTGGGKSLCYQLPAVCKGG-----KSNAITVVISPL
 MP14995 I-VCVMPTGGGKSLTYQLPALMTS-----GVTLVISPL
 MP12489 V-LTISHSATDQISYLLAALSSLG-----EPGKTVIVSSL
 MP06392 V-VSDRTGAGKTLSEWIPCLALE--ELGP-----SLDKIVIVTPL
 MP09541 V-ITIAPTGLGKSLTFWMPLLFAEK-----SVMIVVVP
 MP13589 V-ITIAPTGMGKSLTFWMPLLFTEQ-----TVMILVVP
 MP15420 T-VLIAGTGAGKTIPFMLPLLLDKK-----NKILVISPL
 MP14167 V-IAVAGTGAGKSLIFAMLAIACEL-----VGYRGVIIVICPL
 MP16505 V-VVIAPTGSKGSLAFSLPLLARGR-----GVSLVIVPY
 MP11895 L-FLIAAMGQKSSFVFPVLLVHLELQEHPELYPSFSGFK-----TREWPAVVVTPT
 MP12680 --MCITATGDGKSALFAVPILVHLEISQNPSPKYPRFN-VP-----IKKNPVGLVIVPT
 MP12680 --MCITATGDGKSALFAVPILVHLEISQNPSPKYPRFN-VP-----IKKNPVGLVIVPT
 MP16430 L-MCITATGDGKSALFAVPILVHLEIIRNPSKYPKFN-IL-----MKEKPVGLVIVPT
 MP16519 T-ISVVKTTGGGKTTYLSGFMVLLQELDKLPPTHSLKQDL-----TRSFKNPVTIVVYPT
 MP00762 V-IAIAQTGSGKTISFALPAMLHIN--AQPLLEP-----GDGPIALVLAPT
 MP12150 L-MACAQTGSGKTGGFLPILSASF--TNGPRVPPEQSTPAAYNSRGRKAYPTALILAPT
 MP01830 V-IGVAKTGSGKTIAFLPLFRHIK--DQRPLEP-----MEGPIAIVMTPT
 MP02642 V-IAQAQSGTGKTATFSISILQSIDV-----TVRETQALVLSPT
 MP00233 V-IGIAETGSGKTAAFVIMPLAFIS--SLPPFTE-----ENRHLPYALIMAPT
 MP14297 V-VGIAETGSGKTLAFGIPALARLI--SSPPQG-----TSTITTLVLAPT
 MP04844 I-VGGAVTGSGKTAFTIPMLERLL--YREKGGK-----AAATRCLVLVPT
 MP07090 L-AAISPTGTGKLSYLLPIMTALR--SPAASHQEN-----EEDVGSGVRALVLAPT
 MP16544 -----
 MP03701 V-LLIAPTGSKTLTSILLQMIKTN-----SDITIIIPL
 MP04710 S-AVFAGTGSGKTLVIALIWMGTGR-----DKISITVSPL
 MP04057 IPAQIADPDTARSTLSGPPILVQIE-----

NC_QDE-3 LSLMLDQVNHLAN-L-----MIQAYAFNGDMNSEMR---MVFQK LDA--
MP07550 IALMKDQVDALVR-R-----GVKAANLDSTLSMEQAR---DVKEQVLD--
MP01699 LALMKNQLQALRQ-R-----GIPVVSLTSETLQYERE---EISQDLSS--
MP00763 KSLMSNQVAAL EE-K-----GIDVVVWVNSESTDV----GAILKRLRS--
MP14995 ISLISDQIMHLRE-A-----GVEAVKLTGATSKSEVE---DINSRLMS--
MP12489 LRPDDEKVVLLKR-K-----GVN-LKFWGDESVPQTS---TLDNKFQP--
MP06392 LLLGQQNEAELTA-M-----GLPCLALNSDTNMPQTF-----KDIVS--
MP09541 KTLGSQFADDLNVKL-----KLPVAVMVTKNITDDTLF-----RDILK--
MP13589 KTLGSQFADELNEKL-----KVPVAVMVTKNITDQALF-----QDILK--
MP15420 KILQADQASRFKK-M-----GILAAAANGDTWA-EVG-----TSMRD--
MP14167 KALQNDQVRRFTE-MSTEYDRRTKNMRTISIPAVAVNEDNNGREVF-----EAIRL--
MP16505 TSLGCEAEKRNHG---D-----GISALFIYSQQNHTEDF-----KRVAR--
MP11895 KGLSESMRVSQK-L-----GLKGLSYTSGTVSDYLHRNINLTKLIYY--
MP12680 KGLGNIVDELEG-F-----GIKAF AFTAENIAEARRSGTKIVQDIIQ--
MP12680 KGLGNIVDELEG-F-----GIKAF AFTAENIAEARRSGTKIVQDIIQ--
MP16430 KGLGNIVDELKG-F-----GIKAF AFTAENIAEARRSGIKIIEDIIL--
MP16519 KGLEEEMEQT FNS-L-----GIPSLAINEDTLKAARRRGEDLWKTA AH--
MP00762 RELAVQIQE CTK-FGS-----NSRIRNTAIYGGAPKGPQI-----RDLQR--
MP12150 RELVSIQHDEARK-FAY-----RSWVRPAVVYGGADISQQM-----RQIER--
MP01830 RELAVQIHRECKP-FLK-----VLNLRVAVCAYGGSPIKDQI-----AELKK--
MP02642 RELATQIQSVVLA-LGD-----YMNVCCHACIGGTSIGEDI-----RKLEY--
MP00233 RELAQQIESES KK-FAG-----PLGFKCVSIVGGRAVEEQQ-----FNLRE--
MP14297 RELALQTHETLST-LGQ-----PLGIACVAVFGGVPKEPQV---KMLRNLDK--
MP04844 RELAVQCYEVG TK-LAT-----HTDITFCLIVGGLSLKSQE-----AALRN--
MP07090 KELA HQIHNECLK-LAQ-----GRKWKLVLFSKATANSLSD-----KNVRD--
MP16544 -----
MP03701 KRLQYSTKDDILNDY-----GLQAVVINQDTPRNREWWD---QNLHH--
MP04710 KRLQITQASDFLQKY-----KILTSLVNEDTDQTESRWK---RNVFNPH
MP04057 -----SITE-I-----GVSA YTLNKT-----REIRE--

NC_QDE-3 -----EHPEHELQLLYVTPPEMVS KNQ-----TFVNKMMDL---YRRKKLARIVI
MP07550 -----G---VIKLLYVAPERLN-NE-----GFINMMRRV-----KISLLAI
MP01699 -----G---NPEYRLLYVTPERMN-VG-----DFKRLLRKV---YDSGNLNLV V
MP00763 -----RLKPSLLYVSPEKLKESG-----SLRSILVDW---HSAGEIARFVI
MP14995 LANGRNIPG---KREIKLCYVTPEKIARSS-----KFVSM LQKL---ASSKLSRIVI
MP12489 -----DVLCMSTLGF LQSGE-----AIIRLIENG-----SISRVI
MP06392 -----G---KYRIITVSPPELLL-AQ-----EFLNLLKDS---KFARRLLCIIF
MP09541 -----L---KYRVII FSPETMVNNP-----SFEALIQHQ---QFMRHLLNLT M
MP13589 -----L---TYRVVIFSPETMVNNP-----SFEALIQHQ---QFMRHVLNLT I
MP15420 -----G---KFQAI FAGPEMCREHP-----SFREALR-----VISNDIVVTII
MP14167 -----G---TFRLVYSAPESLLRNE-----DFKQMF RNE---AFK KKL TACVV
MP16505 -----E---EMLVVYVCP EMVE-SP-----SFASVLHSE---QFQARLSAVYL
MP11895 -----EWEIIIKYP---TFQRNLMLFDV
MP12680 -----S---KYQVVCVDPEHLR-EP-----DWYRIMNST---SFRSNVIFGCA
MP12680 -----S---KYQVVCVDPEHLR-EP-----DWYRIMNST---SFRSNVIFGCA
MP16430 -----C---KYQIVCVDPEHLR-EP-----DWYRIMNST---SFRSNIIFGCA
MP16519 -----S---DLRCLLLSPEQLA-SK-----QFSALITDKSE-GSFFSRIVNLGI
MP00762 -----GVEIVIATPGRLI-----DMLETGK---TNLRRV TYLVM
MP12150 -----GCDLLSATPGRLV-----DLIERGK---ISLANIQYLV L
MP01830 -----GAEIIVCTPGRMI-----DLLTANSGRVTNLKRVTYVVL
MP02642 -----GQHVVSGTPGRVF-----DMIRRRS---LRTRNIKMLVL
MP00233 -----GAEIIIATPGRLK-----DVIERHV---LVLSQCRYVVM
MP14297 -----GKTGLTTRVIVGTPGRIL-----DLMSEGV---CDLSGVDFLVL
MP04844 -----RPDVVIATPGRLI-----DHIHNSPS--FTLDNLDILVL
MP07090 -----KVDIII STPLRLV-----ASLQAGN---ISLSNVRHLIL
MP16544 -----
MP03701 IETKQ--PG---TAELVIVTAEQFFRQKGE-QMLTWFRELMEER---QFTSRISLVV V
MP04710 VPRGK--LG---LYQH LIVTPEQFFKLKE--GYLSRFGLTIRDR---NYTRHLGRVFI
MP04057 -----ERLAAGAEEGQDDGEADNDVQGAGVPVNYPRAMLRLEI

NC_QDE-3 DEAHCVSQWGH-----DFRPDYKAIGE-FRKRFP-----
MP07550 DESHCISMWGA-----SFRPEYLKIAR-FAEELD-----
MP01699 DEAHCISEWGH-----DFRAEYRKLGA-FRDSFP-----
MP00763 DEAHCISTWGQ-----DFREAYQGLGR-LRIEYP-----
MP14995 DEAHCVSQLGH-----DFRPDYQKLRV-LRQLFP-----
MP12489 DNAS--SPWMQK---DMHNYVVRLG-----R-----AHP

MP06392 DEAHCVSIWGR-----SFRQAYMAVGN-LRYFIT-----D
 MP09541 DEAHVVEEWGS-----TFRDAYARIGI-TRHLMC-----R
 MP13589 DEAHVVEEWGS-----TFRDAYARLGV-IRHLMC-----R
 MP15420 DEAHCISQWGG-----EFRPQYALLDD-LRTLMP-----Q
 MP14167 DEVHVIKDWKD-----EFRTDYNQLHD-LRVISG-----S
 MP16505 DEGHLPKETH-----HWRPSYKRLNQ-LRAVIG-----S
 MP11895 EEVHLFRDWGIK-----SFCPAFHNI STFICGHLP-----E
 MP12680 EEAHLIDEWGS-----TFRPLFRHIGTFLRGRLP-----S
 MP12680 EEAHLIDEWGS-----TFRPLFRHIGTFLRGRLP-----S
 MP16430 EEAHLIDEWGL-----TFRPLFRHIGTFLRGRLP-----S
 MP16519 DEIHLILSWGSP-----HFRGAFLEVGN-VLMRLP-----R
 MP00762 DEADRMLDMG-----FEPQIRKII---GQIR-----P
 MP12150 DEADRMLDMG-----FEPQIRIVQ---GEDMPGT-----K
 MP01830 DEADRMFDMG-----FEPQVMKII---NNIR-----P
 MP02642 DEADELLNKG-----FKDQIYDVY---RYLP-----P
 MP00233 DEADRMVHLG-----FEADLTFIL---DKLPAETMAGEDQSMIDISEGQLRAKGR
 MP14297 DEADRMLDKG-----FENDIRKII---SKTKPS-----S
 MP04844 DEADRMLSDG-----FADELSEIV---KSCP-----K
 MP07090 DEADRMLDNE-----FLPQIQEIV---AACT-----HP
 MP16544 -----EWGG-----DFRPEYGILGK-LLARIG-----
 MP03701 DEGHMVSTAGIPHFYQKAFREAYGNLKI-IQIRLG-----
 MP04710 DEAHFTFFAGIPHYS-QQAFRPAYGRLNE-IKIMSG-----FA
 MP04057 SDGART-----LRAMEY-----R

NC_QDE-3 GVPVMALTATATQ-NVILDVKHNLAM-----EDCQTFQSQ---SFNRPNLYYEV
 MP07550 VERVLCLTATATP-AVIGDICDKFYVS-----KTKGVFRT---PVYRPNLAFKV
 MP01699 GVPLMALTATATP-SVREDIIRSLRM-----DEQNLFRA---IHRFNANLFYEV
 MP00763 SVPIMALTATANK-LMVDDITKQLK-----KNWAFFTQ---SFNRPNLKYLI
 MP14995 KVPIMALSATCPP-RVLQDLLAILGLRPVVSQDANGDGTVYFSA---PLYRKNLHYSI
 MP12489 NLPVSAVALDGSQ-PAVEALSILIGM-----QPQSCVKL---KLNRTNVHFSV
 MP06392 TIPFYIASATLPF-HLLQDVRNHLHLP-----NHTRSYIR---SNDRPTIALAA
 MP09541 RVPIHLASATLPE-NIIQALKYHLNLQ-----ADVKIFRL---NVDRPNIFLRV
 MP13589 RVPIHVASATLPE-GILRALRHHLNIR-----LDAKTFRL---NIDRPNIFLRV
 MP15420 GSPVLAASATLNA-QALREVCGKLSISI-----GECFLNLN---GNDRPNIYTEV
 MP14167 DIPWSGFTGTLSH-EAFDVFVEGLGMDSE-----KPFWGIDV---GTDRPNVEYVV
 MP16505 HVPLIVLSATAPT-PHRQFLVEHAGLR-----KDHVVINL---GNYPPELLQVV
 MP11895 EIPVIASTTTCLPGQSTTFICQSLGLKS-----NITRLVRL---SDERDNIQIV
 MP12680 SISRFALTATLQP-----E-----GSFTFIRR---SNERPNSEIIV
 MP12680 SISRFALTATLQP-----E-----GSFTFIRR---SNERPNSEIIV
 MP16430 SISHFALTATLPPGPSTTSVCSLGFQE-----GSFKFIRR---SNERPNTKIIV
 MP16519 GTTLIGLTATLAVGNDVERIMKVLGLQP-----GSFVFARR---SNRRPELQFIF
 MP00762 DRQTLMFSAWPK-DVQKLANDFL-----RDMIQCNI GSMELTANHNIQIV
 MP12150 DRQTLMFSAWPK-DVQKLANDFL-----KDYVFLSVGRVGSST-ENITQKI
 MP01830 DRQTLVFSATFPK-QMDSLARKIL-----RKPLEITVGGRSVVA-AEIEQIV
 MP02642 ATQVVVLSATLPY-DVLEMTTKFM-----TDPirilVkrDELTL-EGIKQFF
 MP00233 SRVTTLFSATMPP-AVERLARKYL-----KRPAVITIGEAGRAV-DTVEQKV
 MP14297 ERQTLMFSAWPE-AVRRLASTFQ-----NNPVRVTVGSDDL TANSRVEQSV
 MP04844 SRQTLMFSAWTD-SVDELVKMSL-----NKPVRLFVDPKKS VARGLVQEFV
 MP07090 KLQKAVFSATLPA-NAEKLAMDLL-----HDPIRIVVGLKDTPL-PLIAQSL
 MP16544 TVPMLVSTATMPL-DILVDIRQKGLP-----ETCARVAV---SNAKHNTALSI
 MP03701 QVPWLVTATMTR-HFLSDLESVV-LR-----KPYQTFKV---SINRSNITYAT
 MP04710 SIPWHALTATAPP-HVYDHISAV-LK-----HEHSLIRY---TSNRPNTIYAT
 MP04057 QIPELKL GATPLG-----

NC_QDE-3 RMKEQ---NLIARIAELIK-----EKYDGQTGIYTL SRKSAENIAKNLQEKHR-
 MP07550 AVAET--LYDKVKHILPLLQ-----ARNGPSIIYVTLQKHTEEVAAQLRGHG--
 MP01699 RYASNPDPNHTMAEICDYIS---TLHRRRGKPSGGIYCRTRNMCTDLASYL RGKG--
 MP00763 YDKKG---KVVDDIYTFII-----KHHANQTGVVYICGRDKCEKVADHFRKKG--
 MP14995 QLKHH-EGSRV MEDMTAWIL-----KHPNDSGIVYCLSKKDTEKVAQELQER GK-
 MP12489 CRRTS---STLGSIASFIR-----TKKHNNHGLVYCLKKS V GKTFAGKL-----
 MP06392 KEMQH--SISSYRDLAFLIP---DNYKLGDP PPRKFLVFFDNTKASEGATKYIQR LP-
 MP09541 KKMEH--PANSFHDLAPFLP---RDIPDPGRPKKFLIFFNTRRTAEDAIEYLRNRLP-
 MP13589 KKMEH--PANSFHDLASFLP---RDVPTNGLRPKKFLIFFNTRRMAEDAIEYLRKRLP-
 MP15420 CRMKS---STDFSSLQNHLP---LDTPLN--DMPKTIVFMNSLKTTHAIRDLCKNHP-
 MP14167 QRIRP--GLSLKSQLAQFLP---PSPIKQPSDLKKSIFYKTRRLARHATGFVRSLLP-
 MP16505 IPMQH--AHSSFMDIAFVLP-----LDICAEDIKKTLIYCDLDMLTEMFWWFFTRLTC

MP11895 RPKPRTQRAYKFKLILKYL-----SGHKTIHVRTILNAYKIYAFLWGQLPE
 MP12680 KQLTSPIGGETEFPQLIEYLN-----EGRKTIHVRTIELSYRVFLFLFNHAPN
 MP12680 KQLTSPIGGETEFPQLIEYLN-----EGRKTIHVRTIELSYRVFLFLFNHAPN
 MP16430 KQLTSPIGGSKFPQLLEYN-----EGRKTIHVRTIELSYRVFLFLFNHAPD
 MP16519 CIFGHGIQGWQFPDLKWIID-----GSRKTIYCRTISLAFRLFVYFWHTSTP
 MP00762 EVCSD---FEKRNKLINHLE-----KIAAEDAKVLIFVATKRVADDITKYLRQDG--
 MP12150 EYVED---NDKRSVLLDILA-----SQTQTQGGPGLTLIFVETKRMADMLSDFLMGNS--
 MP01830 EVRPE---ETKFTRLLEILG-----QMYNEDPECRTL VFVDRQEAADNLLRELMRKG--
 MP02642 VAVEK---EDWKFDTLCDLYD-----TLTITQAVIFCNTRRKVDWLTEKMRASN--
 MP00233 EFVSG---EERKKQKLEILN-----SNLYAPPPIVFNQKKTADMVAKDLQRAN--
 MP14297 EVLDD---SRQKDSRLLYHLRNLGHGPKRPGGSDAIIIVFALYKKEARVEQMLIREG--
 MP04844 RVRAG---KEAERSAILITC-----KRTFKSNVIFVRSKLAHQLRIVFSLG--
 MP07090 TYVAD---DPSKVPSLLTYFS-----QPNYPPVLIFTSTQPRATSLAEELIINGI-
 MP16544 RIMQH---PQDSYGDLSLFP-----STPDATFEDFPQTLIYVNSRTEAEEIQDYLRKHSP-
 MP03701 MSIR---KMDDFSNFHCFLS-----DPFTLSTQPYVIFRENKKWAENLAVYLNTRLP-
 MP04710 HRIIG---NLDDMYNYDMFLKF---TDDGHFDFASQPRIVLFFDNKNLCKNVRNHLMELLPT
 MP04057 -----YKMLIHNVEVRRGIAFLEPKQITLKGHRVVDRDAQQ

NC_QDE-3 -----IKAKHYHASITTEKISVQHEWQ-----TGRVKVVVATIAFGMG-IDKPDV
 MP07550 -----LDCMIYHAGLSSEAREKAQVMFM-----ESDKGIVVATIAFGMG-IDKANI
 MP01699 -----LSVKPYHKGIPPATLDKTLAQWTLPGGSAEGGIDTVVATIAFGLG-IDKGDV
 MP00763 -----LTARHYHAVMDPAEKEELREWQ-----TNKVRIIVATIAFGMG-IDKPDV
 MP14995 -----IKTGVIYHADRSDSDKEMLHTEWR-----KGTIKVVCATIAFGLG-IDKGDV
 MP12489 -----GAAAQLIHGQMSQEMKKDVLNKF-----LGQHPILVILPDFDIAQVYHPRI
 MP06392 ---PSLSNRVKWFHATMTAAYREDVYEEFR-----KEKLFGLMVTDAFGMG-LDLPNV
 MP09541 ---FEQRSRIKWVHAGMMDEFRNAEVHALK-----VGGVEGECATEAVGMG-IDILDI
 MP13589 ---FEQRSRVKWVHAGMTDEFRNTEIHALK-----VGGVDGDCATEAVGMG-IDIPDI
 MP15420 ---ELAGVIDYLALRSKRDKKKVMKRFL-----SGDIKILMATEAAGMG-ADIPDI
 MP14167 ---PHLRNTVYPFTATGSERYKGRMEEFR-----EGKVRWMMCTDAIGMG-CDIPDI
 MP16505 ---LNFSPFYVDIIHAGLSEEHQMLCLRDFR-----NDTTEILLASEKVGAG-MDFKGV
 MP11895 ---DCDHLQRMRYHSLCTDDYNEETFAMVD-----NDHYLQVVIATAGFGQG-ISQKKL
 MP12680 ---GANPLRRIRTFNSLATSTYNKKTIDLIN-----NDPEFQVVIATKAFTNG-IHAKAL
 MP12680 ---GANPLRRIRTFNSLATSTYNKKTIDLIN-----NDPEFQVVIATKAFTNG-IHAKAL
 MP16430 ---GTNPLRRIRTFNSLATSTYNKKTIDLIN-----NDSEFQVVIATKAFTNG-IHAKAL
 MP16519 SD-LPSRRKRFRLLCALYPSNYNKKSRDMFV-----QNPETQILITTDALKVG-NDFPNV
 MP00762 -----WPALIAHGDKEQREDRDVLGEFK-----ASRSPILIATDVASRG-LDVKDV
 MP12150 -----LPATSIHGDRTRQERETALHTFR-----TGRTPIMVATAVAARG-LDIPNV
 MP01830 -----YLCMSLHGGKQVDRDSTIADFK-----SGVVPVIATSVAAARG-LDVKQL
 MP02642 -----FTVSSMHGEMVQKERDAIMAEFR-----GGTSRVLITTDVWARG-IDVQQV
 MP00233 -----WSTSTLHSGKTQEAREASLQALR-----DGHADVLVATDLAARG-IDVQDV
 MP14297 -----YATSALHGGINQKARIQALESFK-----NGQTGILVATDVAARG-LDIPNV
 MP04844 -----MKSEELHGDLTQEQRKALHQFR-----NESVDFLIATDLASRG-LDIKGI
 MP07090 -----PNVDCLHAGMTAKEREDAIGRMR-----RGESVVMVSTEV MARG-LDFKGV
 MP16544 ---SYLPKTAFEFYHRYIDENRKKVIQNGLI-----GGEHRCVMATDALGMG-MDFRHI
 MP03701 --LEYQQKGIIQFYSGAMSQQYLSLAHRSFV----DPEHPCRILVTTSAEATG-INHPIV
 MP04710 SGLPHPRDKIVQYYRGNMSSKYLQQCHEDFV----SDNGPCRIYCTTKSNSTG-IDFPHV
 MP04057 DL-----EFA-----QSLRDR

NC_QDE-3 RFVIHQHIPK-SLEGGYQETGRAGRDGKPSD----CYLYFAYGDIQ-----
 MP07550 RQVIHLHMPK-TLEGYSQEVGRAGRDGQPST----CLMFIKADLP-----
 MP01699 RYIIHYDLPK-SFEGYYQETGRAGRNGSHAK----CVLYYSREDAV-----
 MP00763 RFVIHHDLPK-SLDGYYQETGRAGRDGKPAN---CVLYYSYRDFR-----
 MP14995 RFVLHHSISK-SLDGFYQESGRAGRDGNDS---CVLFYRPQDAI-----
 MP12489 QFAIHYQPPQ-SMSEYIYQTSMTGGDGGTAE---CLLYYDCRDLKA-----
 MP06392 EIVVQYRMTS-DICALWQRFGRARGSGTKA----ISILLHEGSVTD AERARAEGRSEKR
 MP09541 YQVVQYGTPK-SLNTWWQRAGRAVRNHALNG---IAILIAEPANFD-----
 MP13589 YQVVQYGTPK-SLNTWWQRAGRAVRDHKLEG---IAVLIAEPTNFD-----
 MP15420 QLAVQFGVPS-SLSVFKQRIGRAGRDPTLKS---RAVLLVEQRMF-----
 MP14167 GLSVVCGIQ--GLSSAMQKGGRAGRMSTIKA---KMVWLVEDWAFD-----
 MP16505 EAVVYKCRGLTIATWEQRRRGRGARDPGTSA---VGYLMVEASMRK-----
 MP11895 LDSISWGCAN-TLDTQVQRNGRVAREKDVFG---RTTVGLWAGDEL-----
 MP12680 VDSISLGTSE-TQNESEQAGGRVGRDPSTHA---RRIILAQPTELA-----
 MP12680 VDSISLGTSE-TQNESEQAGGRVGRDPSTHA---RRIILAQPTELA-----
 MP16430 VDSISLGTSE-TQNESEQAGGRVGRDPLTRA---RRIILAQPTELA-----
 MP16519 EDAVSID-PA-TPEDVLQYGGRAGRKGIQSDPGPRISISYFTKSTLD-----
 MP00762 GYVINYDFPN-NCEDIYHRIGRTGRAGMKGT---SYTYFTTENAK-----

MP12150 THVINYDLPS-DIDDYVHRIGRTGRAGNTGV---STAFWNKGNKN-----
 MP01830 KLVINYDAPN-HMEDYVHRAGRTGRAGNKGT---CVSFITSEQR-----
 MP02642 SLVINYDLPA-NRENYIHRIGRSGRFGRKGV---AINFVTDDVDR-----
 MP00233 SLVVNYQMAS-TIEAYVHRIGRTGRAGKMGV---AITFLTNEDE-----
 MP14297 KAVINYTYPL-TTEDYVHRIGRTGRGGQYVK---SITFFTGENQERG-----
 MP04844 ETVINYDMPG-QLAQYLHRVGRRTARAGAKGR---SVTLVGEADRK-----
 MP07090 REVINYDFPT-SVQSYIHRIGRTGRAGREGK---AVTFFTDEDAP-----
 MP16544 KRVLVWHEPR-TFSSLVQKIGRCARNPNDIG---EAILFLTKTSFNRH-FIQLD---EKE
 MP03701 DIVCVAGFQD-SLALQMFMFGRCCARRPGSRG---LAVLLYEHWAHD-----
 MP04710 DIVVNVGLPP-DACESLQRGGRVRRPGRIG---LYLVLYETWVDE-----
 MP04057 LRLLDPEAPQ-DLPAPITNGGRA-----

NC_QDE-3 --SLRRMIA-----
 MP07550 --ILEGFCRG-----
 MP01699 --HVRRWVS-----
 MP00763 --AIVRMIN-----
 MP14995 --TLSSMTY-----
 MP12489 --ISLRA-----
 MP06392 --AEAQKIAA-----LAAALGKRKADNTLTQSPRKRAALVSLPTFSQPGDPSPLT
 MP09541 --DVKEESARKREEAEKKKRDEGEIQRVAVANAIAAAQASRA-----
 MP13589 --DVKEELA-----LNAIAAAQTNST-----
 MP15420 --VRQKKR-----KNGKLIGEASRNES-----
 MP14167 --E-----
 MP16505 --DSAEYSA-----
 MP11895 -----
 MP12680 --KAQKIVS-----CMVY---AYSGFL-----
 MP12680 --KAQKIVS-----CMVY---AYSGFL-----
 MP16430 --KAQKIVS-----
 MP16519 --RAKSVLNG-----
 MP00762 --QARELVG-----IL-----
 MP12150 --IVKDLVE-----LL-----
 MP01830 --YSVDIYR-----AL-----
 MP02642 --ILRDIEQ-----FY-----
 MP00233 --VMYDLKQ-----EIS-----
 MP14297 --LAGELLR-----VL-----
 MP04844 --MLKAAIK-----
 MP07090 --FLKSIAN-----VL-----
 MP16544 DEHMRDIAY-----
 MP03701 --INISEFDD-----WPGDLS-----
 MP04710 --IDTDYTD-----NTINEY-----
 MP04057 --PLRDISP-----PPAELT

NC_QDE-3 -----DGEGDYA-----
 MP07550 -----
 MP01699 -----DSHskRV-----EHTDP-----
 MP00763 -----NPSNNQQ-----LP-----
 MP14995 -----SEKDAQA-----
 MP12489 -----NEQQRKV-----
 MP06392 LQDNSPHSPHTPTRKHARTGSNGSDVENSpskrPKKSPQ-----
 MP09541 --EGSRASGSQSKKRKSKT-----NREQPNPKRRKANQ-----
 MP13589 --QGPG--SQSGRKQA-----
 MP15420 -----GDSGSDEESDSV-----LGDDEGDDGDGDGEHDDTSTL
 MP14167 -----PEPPDEEQKRK-----PKGKHLALE-----KRREALD
 MP16505 -----AEQDPGI-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----GSPSHKA-----LALP-----
 MP12680 -----GSPSHKA-----LALP-----
 MP16430 -----SLP-----
 MP16519 -----KNQDPETV-----WESVPE-----
 MP00762 -----REAKANV-----PPQLEEMTM-----
 MP12150 -----REANQEI-----PNWLEQSAHE-----
 MP01830 -----KASSATV-----PKELEDLAN-----
 MP02642 -----STQIDEM-----PVNAAELI-----
 MP00233 -----KSPVSKV-----PIELAKHEAA-----
 MP14297 -----KGGFDC-P--ELQKFPTTI-----
 MP04844 -----HGAGEDKVRHRIVP-----PEAVSKWAEKLEELKDEIG-----

MP07090 -----LQSGSPV-----PDWILKLPK-----
 MP16544 -----AEENEET-----MLVPDLTRIAAIDVE-----DPIRDEEDIE
 MP03701 -----EGDNPDW-----PHRL-----
 MP04710 -----DPDRPRA-----P-----
 MP04057 -----NNPHFDEDEDQPRR-----RRIPNRTSSPAPI-----

NC_QDE-3 -----QKERQLQMLNRVV-----SY
 MP07550 -----
 MP01699 -----NGPPPSQRSISSLSQLV-----NY
 MP00763 -----PESIKRQEAQARNVV-----EF
 MP14995 -----KLHGML-----SF
 MP12489 -----VDY
 MP06392 PSPTTLGRRFAIKQRLYQRPEAHRQMAYRAIEALRSPSKGKSNKSRALPLGSALDDFVN-
 MP09541 -----SGPTTSQKAKAETDVFGREIKIEATMDDYINA
 MP13589 -----
 MP15420 ATTASMGVEN-----DGKEWVKKVEDAMRQWI-----
 MP14167 PAARTF-----INRTRGACQEH-----
 MP16505 -----LEL
 MP11895 -----
 MP12680 -----LVNFKEGLPQSKKNEMDFAKAL-----
 MP12680 -----LVNFKEGLPQSKKNEMDFAKAL-----
 MP16430 -----SVDFKKGLPLSKKNEMDLAKAI-----
 MP16519 -----DLGTDGEGKMTVGMARLLLA-----
 MP00762 -----IGGGGGGRSRYGGGGGGG-----
 MP12150 -----ANFGSSFRGRGRGGGRGGAR-----
 MP01830 -----GFLEKLTGKAKAAGSGFGG-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----QHKVSREMKRKRDAE-----
 MP14297 -----KKKEHSAYGAFY-----
 MP04844 -----EVLKEEKEEKQMRQAEMELK-----
 MP07090 -----SKMKRREMGKIARSELVNP-----
 MP16544 PVKAMFSRRG-----KRRGATSQLEARDRRYL-----SY
 MP03701 -----IKSEHPSEKERNCAAIH-----
 MP04710 -----LKEKSTRQERAPYSMVS-----
 MP04057 PSSSTL-----TSSNRKPKANTTPHSSKIPK-----DPINI

NC_QDE-3 CESQHTCRREEVLRYPGEE-----FDYRKC-----RDGCDN
 MP07550 ---DTC SRNDLELWLRE VATKEPASDKT-----IDFNHYQQSKVYDI--RANVLG
 MP01699 AENTDICRHVSICRYFGESIDADDP-----EVVKSYSY----DMMCDV
 MP00763 VLNKSDCRRVQLLQFFDER-----FDHKDC-----QRHCDN
 MP14995 AQDLKQCRKQLQFANYFTHSSELSLNSWST-----EES--GALDRC-----GHCDN
 MP12489 CRHDSRCRRVELLSVGE-----DYAGRC-----HQSCDN
 MP06392 APTRGYCRRKVAYGLFGTGNQEDT-----TNHLKCSPAV-DGGCVR
 MP09541 EKRAEKCRRKVVFRHLGNHNIQP-----ITTQHC-----CDR
 MP13589 -----
 MP15420 --ETTECERDFSDRYNNPPVRK-----PPTGEC-----CDR
 MP14167 ----LCMRQFSVQHFRPSPIFPTNISSPGLILRTWVVVDRQLDKPSPC-----CSS
 MP16505 VQDTDKCRTFISDFWMENPDRADKGPV-----C-----GHCST
 MP11895 -----
 MP12680 FLGNSHC FNSINNKIYQNEPLPDTQLD-----CIEASRDEPCSL
 MP12680 FLGNSHC FNSINNKIYQNEPLPDTQLD-----CIEASRDEPCSL
 MP16430 FLGNSHC FNSINNKIYQNEPLPDTQLD-----CIEAGRDEPCSL
 MP16519 ----PCIMAEIDIQFGNP-----KNEVACT-----CET
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----
 MP16544 FIATKKCRIPWDEFFANHEKTPLPFD-----LPRSRC-----CDN
 MP03701 MASSEKCLRAQLADYSLDNDPSALT-----FVTDFC-----CNR
 MP04710 MMQSCRCIRELYAKYLDDKAENALF-----YNGSHC-----CDR
 MP04057 ESDDDDGDGDENAQWLSNTRDRPIKPL-----PARSRLSGG-----

NC_QDE-3 CRNGRISKSTE-----MRDFTEIAFAAIEVVKS----
 MP07550 LLYAQLELD-----YN--HIRAVTPYY-----SVYTIDEKNPS-QVS
 MP01699 CKYPDKTRRRKQV-----LSDEGYANSQASSYSRSSRN----
 MP00763 CMQDGETVE-----QNLTSEAQDVLKLMRE----
 MP14995 CTRPQDEIE-----LRDVTFAVWQILKIVDH----
 MP12489 CESNDVFVE-----TDF
 MP06392 CRPQPMDT-----CCDVCNPSS-----FSEIKHHTVPAPLRAPQRS
 MP09541 CKPRQVTQ-----CCDICNPEY---WRIISTEVFDKVSQSRM---F
 MP13589 -----FDKVTQPRM---F
 MP15420 CLTKQMSSHDS-----AHEIVRPSTPVGQNLSPPGSVHSSPSKDRN---A
 MP14167 SVCSMASDEDQEMLTSHIDDTYNHDQDPGTLSPQT-----SPSKSVHHNDGDDDS---S
 MP16505 CCPALLPTHQ-----F---QFVAVYPESSV-----QAA
 MP11895 -----
 MP12680 CCTRYHIPEDTRI-----Y-----TVPHSPLLPFKTPTTPTASQPSSSRA----
 MP12680 CCTRYHIPEDTRI-----Y-----TVPHSPLLPFKTPTTPTASQPSSSRA----
 MP16430 CCTRYHIPEDARV-----Y-----TVPDSPLLPFKQTAPTALQPSSSRA----
 MP16519 CSQPAPRLPHPSIC-----RCSGCDPSS-----RPRSKSAPTLPKASSAPRA
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----KGLDRLDQERDAKEK
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----KGQNMIEHEAEIFSR
 MP07090 -----R
 MP16544 CQPESFPVE-----AIKVLYPFP-----TRA
 MP03701 -----HPDSGF---SLAKMLPGP-IGPEKIPAPKMPECLLLPRD----
 MP04710 -----H-DDGF---NLQWIPGKIL--TRVPEAQVEATKTTERN---
 MP04057 -----AADASSPGK-----D

NC_QDE-3 -----QQPITL---GKLCDILMG-----KRKNEHGGV
 MP07550 ADTTKIGNIVRKALR-----AKKAVDV
 MP01699 -----ENENSG-----RGDSRRAEGN
 MP00763 -----LSQQKVTM---DHCRAVFKGANTE-----TIRTKGHNNL
 MP14995 -----ITREGGDVTA---AQLAGLVRGSGGGG---FNATSGNGGRRKKGATKEKVQLDL
 MP12489 SLEARLATELIKQLSL--KNVTLRYCREVFAG----HRTA-----EVRNNRGHEL
 MP06392 TMYPYVASEQQNSFR---EELLSWRSRA-----AVEVLGGSTT
 MP09541 NPEEYTRGAQERKLQ---EDLEKLREELW-----TEKLVKNGN
 MP13589 NPEAYTRGPREKKLQ---EDLEKLREELW-----AEKLGKNGN
 MP15420 NGKRRMAKKRREVPVPA---TRKHDFLKDTRAS-----
 MP14167 NSAVRCSKGDREKILM---ENIEMWRDEEWG-----RMRKNN
 MP16505 YYRRQIPKTGSDAVL---EKLKEWVEKEWLDH-----W-----QDW
 MP11895 -----
 MP12680 ---TKVTKKEAEGVR---ERLKLYEGELW-----KEERLRGSH
 MP12680 ---TKVTKKEAEGVR---ERLKLYEGELW-----KEERLRGSH
 MP16430 ---TKVTKKEAEGVR---ERLKLYELELW-----KEERLQGS
 MP16519 SSGIPMAKRLNEKMAYGHSRSLRFYKIWDSATD-----AST
 MP00762 -----GGRGGGRGGGRGG
 MP12150 -----SNGRDYRQGGGGGG---YSGGGGH---NG-GGYSGGGYGG
 MP01830 AERKAYGEPEDKTA-----AAPEEGTAK
 MP02642 -----
 MP00233 -----DQG-----
 MP14297 --RDDIPVTERKKIV-----
 MP04844 PARTWVFQSEKEKKVA-----
 MP07090 NIGKKDASKKKEMIA-----
 MP16544 SRAHKVSDLRDAVV---AALQKWS-----FAHKRDYTGQ
 MP03701 -----EDQQENLR---HALEKWLDNAFDWVHLHLPKNF-----I-----
 MP04710 --KYRMPTTDRPILE---QKLLDWREQLPEKL-----
 MP04057 TGKQKQPAKPPKVVMM-----

NC_QDE-3 CHFGIAKG-STQRELQRIVLQLNFHKALGEDNIMNGAGM-----PITYYITGPEAGA
 MP07550 VELAAATG-IDRADLTK-----ILSWEMDGYISTKPSQVR
 MP01699 TGWGSQSV-----LGGNDSWTSRNTAANNPQTAR
 MP00763 SLYGAGKH-LPNDLLEQLFKRLLFLEAIEEVSVMGNAGF-----HTYYLQIGKRS
 MP14995 DDVCGGKVELKKEEIEYLLVELLLQKYLGERPL-----ATAYSVNMYMALGLPLATR

MP12489 KQFGAGSH-LPYDHVEQLFEELYLLDAWHEAEGDD-----DQEW-DMLIVKAGTAISQ
 MP06392 QRFGTKAF-MPDATAFDRIVGLVHR----NKLRTSKDFER---EIKWRPEFMASKYLPEILE
 MP09541 GLLPPEAL-WSQKLLMRMVDLAHY----NKLTTEQLRK---QVTW--HYTETLGPRIE
 MP13589 GLLPPEAL-WSQKLLMRIVDLAHY----NKITTEQLRK---QVTW--HYTEALGPRIE
 MP15420 -----LEKFRLNVV-----
 MP14167 FMLSXHWV-ISDENIRRIVEKAHLLLRCEIDV-QLIRS---ITKW-PLASEQILASLLK
 MP16505 HGYGPDSV-VSDRDLEVVAKQA-----GAINCAEDIRKLTTHIPHW-----HQVGDRLFD
 MP11895 -----KHDW-----
 MP12680 RNRPRSSY-FPQSLVDIFVTQLLTF---DSQDSLDSVLT---SNSW--PFTASQNAKLFQ
 MP12680 RNRPRSSY-FPQSLVDIFVTQLLTF---DSQDSLDSVLT---SNSW--PFTASQNAKLFQ
 MP16430 RNRPRSSY-FPQSLVNILVTQLLTF---DSQDSLDSVLT---SNSW--PFMASQNAKLFQ
 MP16519 LALTPEAL-LPDDNIKRFN-----DFAKIFADVEK---ILPYLNCFFKAYAAPLVE
 MP00762 RGGYGGG-----DQG-----
 MP12150 GGYGGGY-----GNRASS
 MP01830 GANPKDGD-----DMTF-----GNFKVE
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----EAISKKQYEAGY-DPTSSAKGKSKKA
 MP07090 -----
 MP16544 GIIIEDYL-LDNDIIQKIASRP-----RAVTDNIFRR---VIPW-ALGVARYGGEVVD
 MP03701 -----LDAVEINLLVSQPFRIT-NASDVTEILQR---GKEW---KDAWGAGIAL
 MP04710 -----KTPDELQQLV-----NGLRR-----
 MP04057 -----IEDDDDMF-----SDDYNSDFLAGINEAEMN

NC_QDE-3 Y-----LYNGKRLM-----
 MP07550 A-----
 MP01699 S-----
 MP00763 V-----LKGSMVILR-----
 MP14995 FTR-----INQADVEAGRG-----
 MP12489 P-----LDRNFKLIVNVRGVPESHGHAATP-----
 MP06392 I-----IGKYFTLDDDD-----HNSGPQCQATGDV
 MP09541 V-----IKEAFP-----
 MP13589 A-----IKKTHP-----
 MP15420 -----
 MP14167 V-----LDS-----
 MP16505 G-----LQEALRSL-----
 MP11895 -----
 MP12680 V-----ILSLQEKIKSD-----
 MP12680 V-----ILSLQEKIKSD-----
 MP16430 V-----VLSLQEKIKSD-----
 MP16519 E-----LKDLEKRFRAM-----
 MP00762 -----GG-----
 MP12150 YSGGGGPPSYGGGGYGGGG-----
 MP01830 IKRGPAPDSSKILGVGGAVVAARRLAQAKEEEKLQ-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 VEEKPKRDKFSGLS---RKAKRRKLAMEEDEGDS-----
 MP07090 -----
 MP16544 V-----VSEQVRLH-----
 MP03701 V-----
 MP04710 -----
 MP04057 A-----MQGEHPSSGET-----

NC_QDE-3 ----LPVPSNKSVEPPSRSKQRSRRV-----DEDMDEQELPTLQRP
 MP07550 -----VS
 MP01699 ---SSMKRPGNDASRTSVDTKKV-----KVDYAPALVTKP
 MP00763 -----Y-----RPPKALKVPPIVKAG
 MP14995 ---HRIQVTFRRAAKKAGKSKE-----KAPKATSSRKG
 MP12489 --ERTLPLYRDDTTDEGS-----F-----VSLAAEPIKSVK
 MP06392 GSSNPQPVGKQKRKTCGTCAD-----GHRASNKKCPRYTEYL
 MP09541 -----SAPSKQPIP
 MP13589 -----SS---TIP
 MP15420 -----
 MP14167 -----

MP16505 ----CLPEAEHEAT-----F-----IPLQAPFYQPPY
 MP11895 -----
 MP12680 -----RKAKSKKSKAVTVG
 MP12680 -----RKAKSKKSKAVTVG
 MP16430 -----RKAKSKKSKNMTAS
 MP16519 ---SIGVEPDQEEDLAT-----RMLSQPETQSTY
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 ---AQIRAAEEAAARAGADTAAHKQAMSVVAKLNAQIRASKLVLQSQIQFESNPDRKVNT
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 ---RAVNAAIRSAKKA-----ARPAKIGEPERRFDR
 MP07090 -----
 MP16544 -----PDPQQQAREEAAKERHLSQ--FLA-----MVEKDQRQILLKVF
 MP03701 -----IR-----VADSRADDAQDPRPLSVG
 MP04710 -----
 MP04057 -----RISTNVSSTSASISGQ

NC_QDE-3 TSTNV-----SSPVRATKKRSSKKAL-----PTLIADYEEPSSDG
 MP07550 CSSRG-----
 MP01699 FSSAS-----SLRKPFKTPFKVPSTIKE-----
 MP00763 SSSKG-----
 MP14995 ASAKG-----SKNQSQNQSDDEDDIDEDIEPQPLFDSIDDEADDG
 MP12489 NSSDPMDDH-----QRSMNLFKMKTLRRT-----IRIELALAKDV-DVLDDA
 MP06392 AAKAAAAAT-----PCPKSQKKTQGNISSQNINPSTS-----
 MP09541 ASSPF-IST-----PLRRQFGTDLTVARLPESPISS-----
 MP13589 ASSPF-IST-----PLRRQFGTDLTVARLPESLTSP-----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 STVSFVDET-----SIASGSSTQVTTGQNRKR-----CEPEVATNH-----
 MP11895 -----
 MP12680 SNTDPMSQTLR-----HLRLNLRSQVQRKD-----
 MP12680 SNTDPMSQTLR-----HLRLNLRSQVQRKD-----
 MP16430 SSTDVNSCALT-IQCHEHSATFTQTYQVKFEEKTCASHQA-----
 MP16519 PSSQPPSSYTEFWTTFGSAPVSVSMQEKNLRASPLSPARR--LLQPSI-----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 DSTDFHAI-----PINDYPQKARWRVTNKETM-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 SSSKA-----KKRARAKVTNSRGGAFDK-----DFGDKA
 MP07090 -----
 MP16544 ECYEAVIDV-----KTGHQVYRTRGGQKYLDDER-----MCQPFL-----
 MP03701 YISNSDDEL-----
 MP04710 -----
 MP04057 HSGTVTASA-----SAGSSHTESITIEEEEDDKENV-----

NC_QDE-3 ----PHGPLHAN-----GYERDNFVSDNVEPEEEEDAFEPV-----RPSRRGPSSR
 MP07550 -----
 MP01699 ----PSPPLASSGT-----TEPDLPPNVPSQEEDGGELTVRSKTPPPAESLPDVS
 MP00763 ---SAPRKPKASNKKQ-----
 MP14995 EDEGLPDLPKMKNS-----GFefe-----DEEDEDHMDWS-----TSYRTKPSTS
 MP12489 TLEMLSLTPPAD-----
 MP06392 --QALPTTSLARYSFFQS---PEPALS-----TSSTSSPTT
 MP09541 ---VVPETPSAQKQKRKYTCGICKQPGHRRDKCPAKTKD-----PENVTPTM
 MP13589 ---PLPESPTAPKPKRKYTCGICKQPGHRRDKCPAKSTD-----PENVTPTM
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----PLPPN-----
 MP12680 -----PLPPN-----
 MP16430 -----
 MP16519 --APCPSQPSPSTSK-----KRRRTEPSAG

MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -VQLIDMTGASVTNK----GIYYEPGKE-----PPLEGPPK--
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----G-----
 MP16544 ---ALPRRPKWDSY-----YEVITEPISM
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 ATRPQHRQTTLYDTLSHT----QQS--QTVSQHLAT-LGPPIDARTMHNPRYAQLDEVH
 MP07550 -----R-----
 MP01699 VTLEQSGSTKVDEILRRKGVDKIRQALYETFSSHSWTDIRLPNDTRK----RAEFLTQVA
 MP00763 -----
 MP14995 -----R-----
 MP12489 -----
 MP06392 ATSKHSNSAFVNNLQ-----SPYPVT---PIQTRY---R-----
 MP09541 DTCTQGQAEN-----
 MP13589 DTSLQGQVGN-----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 TSAPSHSSSS-----
 MP00762 -----R-----
 MP12150 -----
 MP01830 -----LHLLVESNE--EYR-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----SRH-EGVR-----
 MP07090 -----SKR---R-----
 MP16544 ANIKDFMKAGTL-----R-----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----PMPTRH--VR-----

NC_QDE-3 QD-----IVDAFVEEVKVFEEFRNRNHRKPIFTETQYREMAIRWTRSLDAMRA
 MP07550 -----
 MP01699 QELEYLVLSFSSTLDGYEERIKI-----
 MP00763 -----
 MP14995 -----
 MP12489 -----YREFKILKDC-----APLPTESQDDYVTMKWNKC-----
 MP06392 -----SIIPSPL-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----YGQMV RV-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----PKIAPGKRKKMEPSTERS---VEIPL-----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----VEQAVREIKRLLIEA-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----

MP04844 -----AKQGDAIGGMRK-----
 MP07090 -----
 MP16544 -----GYSTLEEFVNSWRLLFFNC-----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 IPDINQDKVDRYGAKFIPLVERFWGNYQEMMGGGYDNPAVAGDEDDDEGPRRTGNGKGGN
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----
 MP14995 -----
 MP12489 -----GQRFLSV-----CIAVND-----
 MP06392 -----AGDD-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----
 MP16544 -----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 KKGGGGGGGNEVVDLISSDEDEPPARAPS---RNAGRGKAQSTRGGQIQDKGRAVNRERGE
 MP07550 -----
 MP01699 -----KVRATRQLQN---KQTSKEDE
 MP00763 -----
 MP14995 -----QAGGKPPRKRQK---TGTSKTT
 MP12489 -----EAS---NTSASGTAKPPRLAEY---RFNAPKSS
 MP06392 -----AASCLLNSSSTAADQP-----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----KGTRSSYE
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----RRSKRQAT
 MP00762 -----
 MP12150 -----
 MP01830 -----SAAAL---QAEMRNP-----TATGR---
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----KAKAKGK-----DKGKKGK---
 MP07090 -----KAKEAGK---
 MP16544 -----RSFNQKDS
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----PRRSRSPA

NC_QDE-3 PIAEEDEEDYGLSDPDIDAIDPDAITASDNSDEEDDDDDDEDLESSRYFSGSTGPPVSKA
 MP07550 -----
 MP01699 DVQEVLQAIQS-----
 MP00763 -----
 MP14995 DVIEISDSD-----
 MP12489 SMTELER-----F-----
 MP06392 -----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----F-----
 MP16505 TIIQ-----F-----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 IVKENIQ-----
 MP00762 -----
 MP12150 -----YGGGGG-----
 MP01830 -----YS-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----F-----
 MP04844 -----
 MP07090 -----MFL-----
 MP16544 FIVEYANTLEDV-----FD-----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 DIIELTDSDS-----

NC_QDE-3 VQDARLREQLSMYASGGSSSKGSYGSGRASGGSSSRASGSGWRGGGAGGKKYYRKKRAGS
 MP07550 -----
 MP01699 -----
 MP00763 -----
 MP14995 -----
 MP12489 -----RFT-----
 MP06392 -----
 MP09541 -----
 MP13589 -----
 MP15420 -----
 MP14167 -----
 MP16505 -----
 MP11895 -----
 MP12680 -----
 MP12680 -----
 MP16430 -----
 MP16519 -----
 MP00762 -----W-----
 MP12150 -----GGS-----NGWW-----
 MP01830 -----VL-----
 MP02642 -----
 MP00233 -----
 MP14297 -----
 MP04844 -----
 MP07090 -----
 MP16544 -----KLEQSITNHSISVTVIPPPRFPDH-----W-----
 MP03701 -----
 MP04710 -----
 MP04057 -----

NC_QDE-3 SAAGGGGAGGGGVTKRKASGSAKTARKRGASTAPKTTTRGGGSGAGSRGGGAGGAGGAG
 MP07550 -----
 MP01699 -----

MP00763	-----
MP14995	-----
MP12489	-----
MP06392	-----
MP09541	-----
MP13589	-----
MP15420	-----
MP14167	-----
MP16505	-----
MP11895	-----
MP12680	-----
MP12680	-----
MP16430	-----
MP16519	-----
MP00762	-----
MP12150	-----
MP01830	-----
MP02642	-----
MP00233	-----
MP14297	-----
MP04844	-----
MP07090	-----
MP16544	-----
MP03701	-----
MP04710	-----
MP04057	-----

NC_QDE-3	AGAGAGGGKRGGGGGGMGGISVMPH
MP07550	-----IVS
MP01699	-----AIRT
MP00763	-----
MP14995	-----
MP12489	-----H
MP06392	-----
MP09541	-----
MP13589	-----
MP15420	-----
MP14167	-----
MP16505	-----
MP11895	-----
MP12680	-----
MP12680	-----
MP16430	-----
MP16519	-----
MP00762	-----
MP12150	-----
MP01830	-----
MP02642	-----
MP00233	-----
MP14297	-----
MP04844	-----
MP07090	-----
MP16544	-----NVDA
MP03701	-----
MP04710	-----
MP04057	-----

Dicer

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.427)

```

NC_DCL-1   MAVATRLPFIPPEATSQIIGGEDLDLID-----LSQEDVVSDN----DDR-
MP14055    MSTTDLL-----
NC_DCL-2   M-----
MP10442    M-----DN-----
MP01869    M-----
MP02453    MNSDDYYDTPDEA---VLGELDVIEAAHASPPKNPKKHPTVSKEDSFFDDSFDFDERE
*

NC_DCL-1   -----GNASDVESDGVKRWTVNPEPKPK
MP14055    -----
NC_DCL-2   -----
MP10442    -----G-----
MP01869    -----
MP02453    LENLDKVI AEAYQCQPAIRPPVSRSSPRATLQTLLGEILPAEASGGSRSFQRTTSKQQN

NC_DCL-1   KISAKKLADTA--AFNSWIEEHQETLARDQRKAAIE-----AARVAGVDVLPAI---
MP14055    -----
NC_DCL-2   -----
MP10442    -----
MP01869    -----LNIWKQ-----
MP02453    KPRNTKQWDHTEFAKSGWRKPKGKSKADEDGGLEDEIPEFEQFPAPFIPGVFYMSVRIR

NC_DCL-1   ---GFDSEIIT-----SPREYQVELFERAKQQNTIAVLDTGSG
MP14055    -----PRRYQEEIFTQAQQENIIAALGTGSG
NC_DCL-2   -----
MP10442    -----PETFTTRGYQQEMLEESLRRNIIAMDTGSG
MP01869    -----
MP02453    ANGGFSSRTGMPPMKLEPDLL EAKHWIYPLNQPKRDYQFNIVKHALFDNTIVALPTGMG

NC_DCL-1   KTLIAAMLL----RWVITGELEDREKGLPRRIAFFLVDKVALVFQQHSFLTKNLDFP---
MP14055    KTYISTLLI----KWMATQDG---ARG---KAIVFLVPKVPLVQQQGDFIAKHSALR---
NC_DCL-2   -----
MP10442    KTHIAVLRL---KIEAERES-----RKVSWFFAPNVALCEQQYNVIKKALPAP---
MP01869    -----RWKGEK-----
MP02453    KTFVAGVIMLNFYRWF-----PKGK----VVFVAPT KPLVAQQVEACHRTCGIPGSD

NC_DCL-1   MEKLCGE-MVEGVESKAFWKEALEQNEVVVCTAEILSTALHHSWIRM-DQINLLIFDEAH
MP14055    VIKLHST-HSLELTDREGWARTFAKYDVFVMTAQIFLNLLTHSLWGL-NKVSLLVFDECH
NC_DCL-2   ---LCGQDGVDSWSEQAVWDAVLLNVRIVVSTYQILFDANAHSFVRL-DSL SLIVIDEAH
MP10442    VTITGASEPNQWKDQDLWRNVLRDWRVVVSTPQVLLDALRHGYIVMGRDISLMIFDEAH
MP01869    -----SEAP
MP02453    AAELTGG-----VAKGMRNKLWRTKRVFYMTPQTLMN DLITENCEV-RDIILLVIDEAH
*
.:

NC_DCL-1   HTK-KDHPYARIKNFY--IDEQLE-----RRPRILGLTASP-----VDAKVDPR
MP14055    HTR-KNHPYNGIMREYM LLSPE-----DRPKVFGLTASP-----IQNAKNPL
NC_DCL-2   NCS-GSHPIARLMTEAY--LPAKKAG-----LPVPSILGLTASP-----LKS--NNL
MP10442    HAS-DKHPYNLIMQEFYFTIPRRSQGTSPGGSDLIQPMVMGLTASP-----IFGG-NVD
MP01869    DVG-----GPE-----DNADVESIVTVP-ST---GEPSSSKR
MP02453    RASGGDYAYNQVIRFMM----AKN-----PHFRVLALTATPGSTPDAVQNLVDG-
.:
*

NC_DCL-1   RAAAELEALLHSQIATAADPAA-LQHTICKPKTELVEYV-----
MP14055    VSLNELQTNMDARVIGVLDHVD ELAQHTPKP-VEVIQEYSISLEQSSYPEPSLWSCINVF
NC_DCL-2   ADIEKLEQVLDAVCRTP TIHREELLAHVNRP-EMLVVSYG-----DSGTDPTPTDLMTRF
MP10442    IAFRKIEGNLDSTICAPRRHREELSEHAHRP-IFKHILYE-----TKTSFSTNLAAL
MP01869    RANNEEKSSRPKKKQKVIDSGVKGQASSCSP-VELTVPYDHHIEHEGTTILSTINTIRIS
MP02453    LHINRIEIRDSESLDLKAYIHEKAVEQH IIP-M-----SGDVIAIRDHLLKV
.:
*

```


NC_DCL-1 -----RGRPDSETVLNKQLRKLVGGQELF----KKPLN
 MP14055 DRATLTAIAECWPDI-----ER-----
 NC_DCL-2 LEAYHRLDISKDPDVLLK-----AQRTERA-REKLRQMITKKDTLAQKELRGVYN
 MP10442 **DAI**VSELNIENDPYVKSRLKDLAKATAGSADYDRI-DRKLSKVIHKQDSFTHKGLRDFSS
 MP01869 GQATQRQLV-----
 MP02453 MDHFSKSLISSGV-----IHHVNLQRI----H-----PYFFQ

NC_DCL-1 FTTSAASKLGTWCADRYWQLFFKQEDIVK-----LESRT---ERDL---MKVAALDEI
 MP14055 RYHVTGLNLPYCASLY--LFMEMKNIISAFYQPDNLPSF----SDDLVVHVPHTTLEDL
 NC_DCL-2 RALLVRREIGPWAADYY--LTRTVSHM-----LAELERGE
 MP10442 AAHAILDDVGSWATDWF--VWEV-----IQQAKLAAG
 MP01869 LSHYVLSEIGPWAVDWVW-----
 MP02453 HKANELKPAQKWAYGHLFKLATLSRIMAY-----LIEGTIGMCHTAM---QKLVAEAKA
 ..

NC_DCL-1 TEKHVKQV-----REAHVLNAHTFSPAALDPTML-----SSKVIMLVIRLDQF--
 MP14055 PEHFDDIVDILDVYEQFYVSRSDYFLLPSTVPLEWC-----TPKIKTLVDILVAHY--
 NC_DCL-2 PAQH-----RYIGEALRSIPIAISKEIQL-----SPKVQTLKVLASHQ--
 MP10442 PLKHMVKTWKVQEKVYLLSILDKISVMPPSYAPEDVA---GDSSDKVAALVECLLYEK--
 MP01869 --KHAWKTGVLARESEVFSVVKSWPDITPNLDLCSDE---FNLSPKVVKLVQLLKSCQ--
 MP02453 EEGSKQKV-----NKAVAITTLPAFKSAMEELEKQKRRGFANHPKMEKMLRLIIDYFGQ
 . * : : :

NC_DCL-1 -----ERGVGAQRCIIFVRQRNTAMLLADLLQQPEIKSHIPSIAAEVLVGGGTTGSS-
 MP14055 -----TPTFQGIIFVEQRQVATCLAGVLPY--IEELKGLVKCGDFFGNVNDVEE-
 NC_DCL-2 QDP-----VGIVFVKERVMSIVTHIIST--HPLTKDRYRTASMIGTASVPGKA
 MP10442 ELA---ENGNEMFVGLVVFVQRDVLALKEKLLSS--HPVTAAEFRVGSLLGTSESSHRH
 MP01869 -----HYGKSFKGIIFVRRRIVALALATALIKA--LGEHLGLQPVAMFHDSS-----
 MP02453 KLPELGGDEQTDQSKAMVFTNREA---VEEIVQA--MDAHRPLLRSRFIGQGTDRG-
 : : * : : :

NC_DCL-1 ---YVNAKINFQQNRRIIRKFKLGEINCLFATSVAEEGLDIPDCNIVIRFDLYDTLIQCI
 MP14055 ---SLRGLTKCSRGPVVKLFRAGSINLLIATSVAEEGLDFPACDIVIRFDPLQHMVAVY
 NC_DCL-2 ---RNHMDMTKKEDMTSLEGRFLGRFNLLVATSVLEEGIDVPICNLVICFDEPSNKSFI
 MP10442 SMMDITRRLAKETQDDTLMDFKIGEKNLIVSTAVAAEGLDIPDCNIVIRFDLYDTLIQCI
 MP01869 -----KQALTEFNCETCNLVIATRSLED-LEIPKVKVLIYYDLFDSHISKA
 MP02453 -----QKGLAQKEQLEVIKFKGAFENVLVATSIGEEGLDIGEVDLIICYDAQKTPIRML
 : * : * : * : * : * : *

NC_DCL-1 QSRG-----RARRPDSRYIQMIEKGNIEHHS-----R-ILRAKGAE-DVLR
 MP14055 QSRG-----RARNKISKFIIMLPEGDVISRA--KYEAFQLAEVHLKDIY-NVSR
 NC_DCL-2 QRRG-----RAREVSSTLYLMVQNASSESAT--DW-HNLE-RLMKERYE-DEMR
 MP10442 QSRG-----RARKKRSTFTLMFENGSGNEQNVMKW-QKLE-QEMVAKYY-DISR
 MP01869 YAHNCLDENGFIYLTQNKYARHRRMLSRISQTSALRQWASTLP-YPTGSAVPPEIQQ
 MP02453 QRLG-----RTGRKRAGIVHLLAEDREEQNFEKA-----KLQYKEVQKSIVR
 . : : : . : :

NC_DCL-1 KFCEALPEDRKLGTGNHMNLDYLLRKEKGRQYTPDGTGAKLSYMQSLVCLANFTATLPHP
 MP14055 PPDDAMDESDSEADEEVEL----DTQDRERYVVPHTSAFINYDNSIALLNHLCALIPR-
 NC_DCL-2 QNAELELLDDPRIGSYPV-----LEVESTGARMTIRDARSHLNHFCAKV---
 MP10442 IEPIEPSVDDIEEDDWE-----FRIGATGACLTLSAIPHLNHFCAVVCRG
 MP01869 DPIDSYLSDSDEEDDTIPEY-----IKDATTGGLITPRNATSVLYSFLSRHGSA
 MP02453 GDQLTFYDDVERLLPDHVRPQCVEKMEIQEYVREPTGRSKSVGNGT-----
 * * . . .

NC_DCL-1 -----PET---SLS---PEYYITVPGGFQ-----CEVMPDASPIK-----
 MP14055 -----DLY---TAPHVPVYTGDFQ-----ATLDLPASLPLHPNDLS
 NC_DCL-2 --SSRSRYLQKEPYFVIRQVN---PDPASPGRRLLQ-----ATVHLPASLAPDLRRHE
 MP10442 V-EHKALYELDPPEY---PLG---WHSFSSQSQAVMQYQGPWASIVTLPRFLPAELRVFS
 MP01869 VPSYKSLFEFD-----EVG-----GGYLRGYT-----CRVVLV-GLPID-----
 MP02453 --TGVKRKRND-----DIGRNPAGASTGFVSVSDLLNKGKSKKRKPNASRPALRDFD
 : * :

NC_DCL-1 -----SAVGKVHLSKGVAKCAAFAFELCLALLKAGHLDNHLQSVFTKQLPEMRN
 MP14055 YE-----GPLKHSKKEAKRAVAFKAVKRLRVLDVFDEYLLPVASEN-----
 NC_DCL-2 SL-----WTWTSEKLAIMDASFQAYKALYNAGLVNENLLPTKVSD-----

MP10442 TE-----PVYMSKVSABRHAHFQAYRCLYEHLLNEHLLPIVDDD-EEVRE
 MP01869 -----CPWSSVSTSKAFARRRASHECCLELFRAGLLDYRFFPPSQKR---LRN
 MP02453 DAIGEDDDTDRELESGVITASTSRLKKSSTAASLSKGTKRLRKSKTMPAEGSK--KSKP
 * : . . .

NC_DCL-1 ARLAVSSKKT-----EYAMRLKPELWSVRGVVTQLFATAFVLENPDTLG
 MP14055 GKAAEDVDKRPLLDY----EGIPVMMDVWVR---DPWG-LGNRDRLLWHPVYMNGGLVAG
 NC_DCL-2 -----FLADLGDDPGHIWVKTQFDPWP---EVAYAWQESSLSYRRLTV
 MP10442 LKKAVERQRMST-----VAVSKQMDPWTVDDEAFSGWYWS-----E
 MP01869 FKKSFVIPPDA-----LPPLGDVYPGNER---TYARKVPEFWMHAAMINPARLFP
 MP02453 KKAKEKEDLQALTSSQFKERGLDDADDVEIERGFD---LPDSSPPSSGGLARAGSSERA

NC_DCL-1 RSS-----RPLLLL-----SRSALPEVASFPLFFGTRKFSKVRVCV
 MP14055 LVT-----GTLPLV-----VKFETFEMGRGNLLVFDKEEEGIQR-
 NC_DCL-2 LVP-----GVENPLEFEFILPVPVYMAPLKLWNNATSALTITSPEMQEFR-
 MP10442 LII-----GDLPLHFFSR-----VKPVDWSSATGPVLHMSVAEQMVIQL
 MP01869 LIIRAAISHSSIPRHAPMLML-----TSQPLPDLPSFKVYFSGIPVE--IQF
 MP02453 IVG-----GGVFDITSDSDID-----IPLDKTRKSKSPR-----
 :

NC_DCL-1 PIPGSVQADDTLVEQLTRFT-LKAFMDVFSKEYEATAVNLPYFLSPMDGGHGFDF-----
 MP14055 -----KMLEEYTRLGIWHMVTIALAAAP---SLYLVPVTDALPDYEVIE-
 NC_DCL-2 KQEGTSAGPD-----HS-YALLAMAFARHF-----PIQGRQYPI-----
 MP10442 RSIGTIEDDDRRIIDARGYT-FLLFCAIYGSRMEANNLDFSLLLLPAGDLREPAWEHRAS
 MP01869 ENAAPITVDDRRLLQGLHMYT-MRIWRNIRNRAFVCPRDEMLYFFAPLRGDEVVKKENP--
 MP02453 KCSQENQADDQSNSEAEVVL-ASSRHSPSSSKLQNDNSVAWLI---DDDDVDFQIVDS

NC_DCL-1 RLA-----KSPAHLIDRKALAYVSENEKVPYTFLEPDDF-----FQDKFVVDYDGA
 MP14055 RLL-----SHPKGVDRDWTGITEA-----D-YGRTLAVANC-NQRG
 NC_DCL-2 RLVSTRRK--LDVDGIAALEFDPRL-----YESSQPPL-----VRLVD-----G
 MP10442 RMSTTQHS--KNPQDIFNANASVFG-----EEFGYPTDI-----VFVRDG-ASFS
 MP01869 TLL-----PDISGAISWDSIALAAQHYAVPMKFGSVEDVALD--IEDAVIQDRWAQFT
 MP02453 SPVANRQKFRDMDSDSVEF-----VENSPSLGGRTDDGFYDDGSMIILPSP-VKKG
 : .

NC_DCL-1 RKFFTHHRRHDMKPTDPVDPGIVA-PNHRWRGLGTTTHDILNYSNSLWSSKSRG-----F
 MP14055 RTLLHKIRHDLSPMSPPLPGSEG-AEYASYEY-----YLNWRTRKRSRSDRSNWT
 NC_DCL-2 RNMPYFVTK--ILPSKPPVELISK-PSTDHAD-----
 MP10442 RPYKFVWRWFSEPLSVEEE-----EKIRSWKRYAKEDS-----
 MP01869 RRYDVRLRPDLNPLSPPFETEPGNPKYKTLVDFCKAH-----RKDFN
 MP02453 GKARADVSR-DADPPPSQRSMPP-PQLPSAR-----
 : *

NC_DCL-1 MIFQADQPVVEAALISTRDFL-----DDTLRDEDVEPQQCFILILEPM-RISPIPA
 MP14055 PFLPTDGHMIEVSAAPRISSGLYPLTS----TSGPSTKPTTVSETWLIPQGCCSWLPPISE
 NC_DCL-2 --LPENVPYVVKPIGKAVGQFIPLDAIQ-DQDSWTPKNGKLYRKVLPSTQI-RMDNFPA
 MP10442 --LEIAFPLVVVEPFSRRTNPLVPF-----PTSAKPAPPAIEPILLIAELS-TITMLSP
 MP01869 GLNDYNQVLVQVSRFPVFDRLNP-----STPAGTEHGDSVVRYFIPELC-AKCTIPA
 MP02453 -----FVSASSLLSSNSPPEPSFAVRPAGKAKKPVVIEDS-----PMAE
 : .

NC_DCL-1 DVVAMLLCFPSIIHRVESNLVALDACK----LLGLDLRPD-LA-----LEAFTKSDSN
 MP14055 TMFLTWRALPVLCRITDIYRAREAKF----ALGLPPINDTLL-----LQALTIPAAS
 NC_DCL-2 VFAQVGAVIPAFTRAVEMSLVAADLMYNRLGCLQLDNLP--LI-----TTALISSGSR
 MP10442 TETRYALLPSVLRAIAVAITVKSRLTSLFCATPLSEIPNDIL-----TVAITAPVSQ
 MP01869 STMRTALLFCILQRIDEFLLIKELNV----RLFNSVIPDTLL-----HVALTTRSAG
 MP02453 SPVVRRRRIRRLDDEPGSPRPKTKKPK----RKPLVPPKDNLWCDFEATHSGDEVSQSS
 : :

NC_DCL-1 SDEHDAEKENFQTGMGDNYERLEFLGDS-----FLKMATTIA-----IYTLI
 MP14055 A-----GWNNQRLETLGDA-----VLELCTTVH-----LFNKY
 NC_DCL-2 G-----PTNYERLEFIGDT-----ILKFCACLT-----ASALF
 MP10442 E-----PKNYQRLETLGDT-----VLKFIVCIQ-----LFDEY
 MP01869 L-----EYDYERLEMLGDA-----FLKYLASH-----VFVSE
 MP02453 GDDDDDP-----SDSDRQFLEELPETQVSPSYNQTIYVCNSLMTQAPNGANGPVFSKK

```

      : ** : :
NC_DCL-1   PDK----GEFEYHVERMLLICNKNLFNNALEIGLEEYIRSMFNR-RQWYPEGL-----
MP14055   PYK----HEGQLDHLRRANISNRF LCSRALEVGLERFITSESHKKARAWR-----
NC_DCL-2   PNH---HERLLSQWKDKLVNNVRLCRASRDFGLDEYIINSAAS--KKWRPKFVEDYMDE
MP10442   PLF---PEGYLTMRKDHVSNSNTRLAKENMEREVFKWVIRDRILG-KKWKPNYMTSKLPE
MP01869   PHR---DEGYMHVARQKLVSNKTLLECALSVGLPSYIQRPFSL-RNWQPPNFHV---E
MP02453   PLRKVPFGRGTMSNKRPRGVSS-----
      *
      . : .

NC_DCL-1   -----ILKKG
MP14055   -----YLE-----VEPEN
NC_DCL-2   MKSPI-----SAET
MP10442   ALAPILDQESAEAANS GTANTES-----ATTEK
MP01869   ADVPSISPELAPARTVSSADTERAGSVATSVIPSPDGDTPITGYTDAVPSEIQDPNPTKK
MP02453   --SPPRDEEAEYE-----

NC_DCL-1   KSKDARQRH-----VLADKSIADVCEALIGAAYL TGQEKGSFDMAIKAVTAMVKDKKH
MP14055   RQGKRMVKR-----AYPRRSLQDCMEALVGGAFET---GGIPMALHAGVALGLGFGG
NC_DCL-2   RQ-----MSSKMVADVVESLIGAA YMC---GGMSKALECVALLLPTPKS
MP10442   RSKKSKQE-----MSTKVLADVIESLIGAA YFH---GGFDLACEATKFFDLGLK-
MP01869   KRKSKKKKVVGEQLVTYLGDKAVADVVEAII GA AFVS---GGSDPALRAAKSLNLPIMS
MP02453   -----FGSFVDDDAE-----
      : * *

NC_DCL-1   RMISYGDYAVYQKPTWQTESANSA----QRDMAKKFSERMGYKFKHPRLRAAFQHPTY
MP14055   LV-PWSM-----RYERAQRVPV----SPMFASLEESLGYKFRNGELLREAVTHPSF
NC_DCL-2   SQFKWQE-IELSR TQLFEFAPKDAI----LSKQLEPLEKAMDYTFNKKSL LIEAMTHPSC
MP10442   ---QWQP-LP TRIKSVLGRADRSELNGLQLPEQVNYVETIIGHTFKRKL LVEALTHASH
MP01869   EIEEWSDFRRLAETISWHTPAGT-----RKVPVEKVEQIIGHRFKRPHLLA QAL THLSK
MP02453   -----

NC_DCL-1   PSLYERLPSYQRLEFLGDALFDMVAVDYLFRKF--PAADPQWLTEHKMAMVSNQFLCCLS
MP14055   SS-YSATSSYQRLEFLGDAILDLVVIHYLYK KF--PSATSHQLALPRTKAVCSPALSSLA
NC_DCL-2   AGLGTNESC YERLEFLGDAILDVIVVKRLMAETGPNELAHNDMHEHLSSVVTADIMAF LA
MP10442   QQ-DLGTVSYERMEFLGDAVLDMIVNDYLYR APG-KEYSPGHIYLRKVAVVNGHILAFIC
MP01869   A--HPESTSYSKLEFIGDAILDFMVRHVFD RN--QQLAPGALTLLKGAMVSN SALA AVS
MP02453   -----ISYEM-----
      *
      .

NC_DCL-1   FHL-----GFNKCIATMSPSILKD
MP14055   IRH-----LQIHKIILINVELSTA
NC_DCL-2   MEWVI-MQTDINEIDPTNLDALG LLLPSSQSRTIPASLVSNKEDWPFWR FMRHNSPQVGAT
MP10442   LKASLTIEAEMPRPDET G-----AISVVDEQHTVHLFKLLHSSTHILEE
MP01869   VSS-----GLHQYLLLESAQLEGN
MP02453   -----

NC_DCL-1   ----IAEYVT--EIEEALETAKQEAINAGKT ADEYSRDYVWHITHASRLPKCLSDVVEA
MP14055   ----IAQYVP--HLEAA-----SAATIV---RDGW---R-YDPPKAISDVFEA
NC_DCL-2   QTATIERYLTLRDEIRDAIWKHNTLP-----WALLAR-MGPQKFYSDIVES
MP10442   QDNTWARFRLHRQEIEEDLSEGQIFP-----WAALTQ-LQAPKFFADMIES
MP01869   ----IQSYIT--TIQQKESEERANA I KEHRLV---GQYW---HDIEAPKVLADIVEA
MP02453   -----

NC_DCL-1   YIGAIFVDSEYDYSVVQNFF-NMHVLPFFEDM HLYDTFANKHPVTFVANMMAHKFR CN--
MP14055   IMGAVFIDSGYNYEVTAGVV-ERVMQEVLE---VLSPTVCLDPVSILTKWVAGNKCR LKV
NC_DCL-2   LIGAVWVDSG-SWKACEDVLTQMGLL P LLDHL-LETKAHV MHPNVELQILAPPNKRATRT
MP10442   IIGAVYLDTEGDLEVVRSLRNGLMQILERI-VREGIDVLHPVSRLSMWA--SKKGKKI
MP01869   IIGAVYISDDFCPIGAEKLF-ERV LKPFYDEH-ISLQTLAHHPTKLLLELFQ-SKGCHQF
MP02453   -----

NC_DCL-1   EWRSFAKELDTDVTEG----RGGRGGNGAVAGEISEINP--PKVV-SALLVHGKTVVHA

```

MP14055 EFRPQTKEAGD--REG-----IEARLHGVLLAGP
NC_DCL-2 EFVIISNKRGI-ISSGTEFLDEPSAVDDGLVSVPEYDDTPEHDEVFSCKLFVGGKQVADV
MP10442 EYHSDREY-----GNVY-CSILVDEEEVARV
MP01869 EIVREEEQ-----CHVLVHVDVILASA
MP02453 -----

NC_DCL-1 V----AASGRYAKSAMAKKAIKLEGM--SVEEFRERLGCNC-----
MP14055 IV----SNSMSVAKNMTAERALDALQEL--GGEKALVKI-CTCAVAKVTAVTSAMERLGD
NC_DCL-2 T---GAATKEEARVRAAEKGCLVIKA-----ERKVVNEAKAA-----AKEDKGH
MP10442 SANYHGNTSKEEVRLAAA EKAIKILHLRDVGANYNILKK-----
MP01869 H----DSNAAAAARLASVLGLDALEG----DPGFLRRTCNCWAQR-----
MP02453 -----

NC_DCL-1 ---KG--VPMEVDGG-----VPEA-DVDGEVHGTV
MP14055 EMAIGMDISVNTDPGEKG-----KAGTV-----
NC_DCL-2 NTENG---DANADNGQSKEEVPDCRDADGDTV--MN
MP10442 -----VEGR-----
MP01869 -----NTKAGEKR----VLTG-FKEGEFE--LD
MP02453 -----

RPA-1

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.427)

```

NC_RPA-1   MAGQITQGALDAM-FNDPDRAQQQFPVILQCLQIKTLDSKNGGAGATERFRIVLSDLKN
MP11091   MSYLLEEGIAERLQYAEPDDVQLLTAPHILQVLSVKAIVN-----GGRDLHRVILSDGVY
MP08906   M-----
MP10591   M-----
MP01410   M-----
MP02314   -----

NC_RPA-1   YVQCMMATQTNHLVHDGLLQRGCIVRLKQYQAQCLKGKNILIVLDLEVIQSLGCPEKMGD
MP11091   YIQALLAIPLTYMVSENILTKNTIIVTQKLSCNFVQGKRLILLGLSVQGG--CKEKIGD
MP08906   -----
MP10591   -----
MP01410   -----
MP02314   -----

NC_RPA-1   PQPLGPRSAEPQQNPNLGSTGFYGVKSEPTQDTKPQFPRQMPSRNASGGQGSSTIYPIEG
MP11091   PTTI-MKNGKRRTKPA SATTTPAVVRAEGSTTGQQQH-----YRVAQGRSNSRPVDPIQT
MP08906   -----SNEASPRVN
MP10591   -----SDEASPRVN
MP01410   -----SQDY YGTGGGFTASPFSG
MP02314   -----

NC_RPA-1   LSPFCHKWTIKARVT---SKSDIKTWHKASGEGKLFVSNFLDESGEIRATGFNDQVDQFY
MP11091   LNPYQNNWTIKARVT---RKSDMKARSNQYGVGKSFYVTLMDESGEIRGTAFNAVADDLY
MP08906   SSMLSRFIGKKVRL-----
MP10591   SSMLSPFIGKKVRL-----
MP01410   SAAGSPGGRLKTDLSHSLRPVNITQLHKATQAHA--DSEWQLENAEL---GQITLVAQVV
MP02314   -----

NC_RPA-1   DLL-QEGQVYYISTPCRVLAKKQWSNLPNDYELTFERDTVIEKAEDQTSVPQVRF----
MP11091   GRL-DEGKAYYIS-KAEVILASDKVSDVSSDYELWLERNTEIEECLDTSNLP MVK-----
MP08906   -----PCKVL-----TINKAANRATVQASDG---
MP10591   -----PCKVL-----TINKAANRATVQASDG---
MP01410   DITKQTTNTNYKLEDCSGVIEARHWSDQNSEDDRKFGHVQPMTYARILGNLKQYGGKRYI
MP02314   -----

NC_RPA-1   NFNVIQELQDVER-----DATVDIIGVLKEVQEVTQIVSKTTQKPYDKRELTLVDNTG
MP11091   -----
MP08906   GDVEIQAFVEDPG-----VAYIEVIGM---VVDETT V KSVGV I KFGDNLDMSTVEAT-
MP10591   GDVEIQAFVEDPG-----VAYIEVIGM---VVDETT I KSVGV I KFGDNLDMSTVEET-
MP01410   NATHIRTCEDPQESFFHQLETATVHLMHLNRPPGSAGQPQSNAA-----TSTRG
MP02314   -----

NC_RPA-1   YSVRCTIWGKTATNFDAQPESIVAFKGTKVSDFGGRSL SLLSSGTMAIDPDIP EAHHLKG
MP11091   -----
MP08906   -----
MP10591   -----
MP01410   PGVSAYTASTSTGNSDAYPE-----
MP02314   -----

NC_RPA-1   WYDSSGRNNTFATHNNMQTLGGATGRKDDAKTISQVKEENLGTNEAPDYFALKATVVF I K
MP11091   -----
MP08906   -----IKIIHD-----PRF-----VSVF--
MP10591   -----IKIIHD-----PRF-----VSVF--
MP01410   -----YANLPPL-----ERKIIIAILEH-----PDH--DEGGVFIG
MP02314   -----

```

```

NC_RPA-1   QDNFAYPGCRSEGCNRKVTDMGDGTWRCEKQCINHDRPQYRYIMSVNVNDHTGQLWLSCF
MP11091   -----
MP08906   -----
MP10591   -----
MP01410   -----KIASSVSGT-----
MP02314   -----
    
```

```

NC_RPA-1   DDTARVIMGKSADELMEIRETDETRLPAEFEQANCRKLNFRRCRAKMDTFGEQQRIRYQVM
MP11091   -----
MP08906   -----FP-----
MP10591   -----FP-----
MP01410   -----GSGEEMVAKISEA-----
MP02314   -----
    
```

```

NC_RPA-1   SVAPLDYKMEGNKLNELIN-SYNQMSM
MP11091   -----
MP08906   -----
MP10591   -----
MP01410   ----LDLLMDGGHIYSTIDEAHFRVSR
MP02314   -----
    
```

Argonauta

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.427)

```

NC_QDE-2   MSD--NRGGRGGR--GGGGRGGGGGGGGRGGGQ-----QGGGG
MP08788   MSN-----RGEGRGRGGYRG-GDRGGFRGGDR-----GGFRGG
MP08974   MSY-----RGDGRGRGGPRGGDRGHFRGG-----
MP10832   MSSSSSPGGRGRGRGRGN-EGGGRNRGRGRSGE-----AASGG
MP03238   MHR-----
MP03267   M-----
MP07032   MAK--GKKRQKQKASEEASSTSSRAGQSTSTRVPVSPQAAAAASASSSTPTESPSAAGP
MP08202   MPP--RPTRGDP--PRGGRGTPPRGRGDRGTP-----
MP13872   MPP--RIERGGSRGSDGGRG-GGRGRGGGGG-----
MP13876   MPP--RIERGGSRGSTGGRG-----
MP03288   MSA-----
MP12999   MINPESMKTRAKADLVQNVRA-----
MP07178   MPG-----LPKKPVVD-----
MP07431   MGK-----SQKAQKN-----
MP13957   MRT-----SQ-----
*
NC_QDE-2   ---GRGGGYQGSGGGGGRGGGYQGGGGDRGGRGGGYQGGGGGFQGGGGRGGRGGGFQG
MP08788   ---DRGRGS-SPSRGR-----GGGGG-GFQ-
MP08974   ---DRGRGA-GPPRGR-----GGGGRGGGGGG-----
MP10832   ANTGRGRGATGDGRGRVSQGSIRG-----LNTGAGGFPRGDGRGRGIGHE-
MP03238   ----GRGRGGPSRGG-----
MP03267   -----
MP07032   ASPPTRRSAWGATDSR-----
MP08202   --PPRGRGDRGTPPPR-----
MP13872   ----GRGAAGGGRGG-----
MP13876   ----GRGAVGGGRGG-----
MP03288   -----
MP12999   -----
MP07178   -----
MP07431   -----
MP13957   -----
NC_QDE-2   GGGGGRGGFGGGQGAGGYEPPPPDVYKIDGRGAPE-----PDAQITKLEDDWIKKHVS
MP08788   PQERG-----GVFIPPG-----SGPP-----QLDARLTDRE-----
    
```

MP08974 --GRGRSM-----PAIFKEG-----APA----TIDPRLRESDL-----
 MP10832 PRGRGRGD-----SNVRSRGG-----SGPR----GRDSRLRESDL-----
 MP03238 PRAPG-----SAFRPPP-----SEIQPG-----
 MP03267 -----
 MP07032 ----PVALVGNVSVSGTRSQPQ-----SPAAPAPTITPVTAASITTSNT----QQP
 MP08202 ----GRGDRGTPPPRGGFPQAG-----RGGPPAGQGTPQTG-----PVA
 MP13872 ----GRG-----SGFSAGG-----GGGG-----GGGSISTSSS---LPNV
 MP13876 ----GRG-----GGFSAGG-----GRGSGG-----GGGSISTSSS---LPNV
 MP03288 -----
 MP12999 -----SLLSKNPISTLLSSDTSIDPSI--VEILDSEALSTDD-----
 MP07178 -----HKFTFPP-----FPKAPE-----
 MP07431 -----HAYSFPP-----FPSPPP-----
 MP13957 -----

NC_QDE-2 DNLVTSMSKLSLSEKEKANNLPVRPGHGTMGEEKVKLWANYFKI-----NIKSP----
 MP08788 DALVASLKSMLK---GDEIPLRPDFGTLGQKITLRNFFPV-----RVPKG---
 MP08974 NALIGTFQGLQLG--SNAPERPLRPGFGTQGTPIILRANFFPY-----RLPED---
 MP10832 NALVSSFQRLQVT--SNNPERPLRPEFGTRGKDILVHANFFPY-----KLPKD---
 MP03238 -----GSNATMVTTLNLFPI-----TKLPNK---
 MP03267 -----
 MP07032 ASHVVPLGGFK-----RTKPGTGGRLIKVKANFTPVDIEVDGRSRQPRSRVDI
 MP08202 SAHVTATVGVV-----RPGYGKAGMGIKVSTNACDV-----SVPQR---
 MP13872 SNHIT-TIGVK-----RPNFGSSGRVVPVIFVNSYRT-----TIPQT---
 MP13876 SNHIT-TIGVK-----RPNFGSSGRVVPVIFVNSYRT-----TIPQT---
 MP03288 -----QHPRFGTSGTPVNATVNAFRL-----KWSSR---
 MP12999 -----RNYRQLCQKCLRALANKHRI-----KAIPPSLFI-
 MP07178 GVTIVPFKDFEE-----RGIS---KAPISEQEVDAL----GIPTV---
 MP07431 GTKIIPFKDFQE-----RGIQIHLFGANDDEQEIDGF----GIPTV---
 MP13957 -----

NC_QDE-2 ----AIYRYT-----IKVAATEEKLKGEAE
 MP08788 ----PLYEYD-----ISITPVAGT-----
 MP08974 ----LVVYEYR-----VEINPQTA-----
 MP10832 ----MIYEYR-----VEISPRCKD-----
 MP03238 ----QYWQYE-----LIITPEVRNF-----
 MP03267 ----VIEGLE-----
 MP07032 RRGDGLYHQYD-----DITPSLKP-----
 MP08202 ----LIYHYD---GE-----FA-----GRVH
 MP13872 ----IIRHYD-----IISSSGAGPSEQ
 MP13876 ----IIRHYD---SQCFFTCFSCALADVYH-----LYLVVISSSGSGPSEQ
 MP03288 ----SIVYHYA-----PITPEWSVQAGKEV
 MP12999 ---NDIVREGKFPVGGG-----YADIWKGSLGGRPVCCLKVLRHLENER-----
 MP07178 ----ALVKVHD-----TDKCK-----TSAPPRVKGKHVT-V
 MP07431 ----ELPKKHE-----TDRPK-SEG-----KVKSVPPLRV
 MP13957 -----

NC_QDE-2 VASKKVEVVVGKLLKQIE-----AN-----VKSVAIASDFKVHLVTTTKLKVPE
 MP08788 -ANRRVKRRILQLAEQTNDW---TAA-----GLKGIVAHDSAKLVAQKQKQP-
 MP08974 ----LKRMMFTLLEESP-----ACQ-----PFINHIAHDGSEKLVSSRPLPQP-
 MP10832 ----EDKTRIFALLEESS-----ACR-----PFLKHIAHDGSEKLVSSKPLPQP-
 MP03238 ----ARRQEIMARLKTNV-----APN-----LFQSLPIYDGMKQVYVCSKLELS-
 MP03267 -----
 MP07032 ----AAAWVLIDRLQLGE-----GPEPIFDGRAIQSQKNRVAYDGKILFAPRPLLGE
 MP08202 VLLNRIMVSILNLLYSRH-----YAR-----QKLSSEGAGVYDGKKNLMPHELDFFE
 MP13872 VLPARVNMEIIKAMQTTH-----AD-----VFTPPAVYDGRKNMFAARELPLST
 MP13876 VLPARVNMEIIKAMQTTH-----AD-----VFTPPAVYDGRKNMFAARELPLST
 MP03288 KISAESLEIIRRMQTTT-----YPH-----KFPVPGASDGKANLFSTMRYSF--
 MP12999 ----RREKVVKAFCKEALVWTHLDHPN-----VLPLLGVN--TKEFFPAFCLISP-
 MP07178 QAVGDQQASIA--RKKE-W-----
 MP07431 TSVKEKEKAVTIPLKRRE-W-----
 MP13957 NALQEKEKGPSMPLKRRE-W-----

NC_QDE-2 -----NRIFEVTWTEPSSNQNLPSKPQTWVVKVEESVE-TCDFGKVLNELTTLDPKLDG

MP08788 -----LTIRVPYSDEGE---EPS-GKEYTLTIKFIQQ--IDTS-ALEQYVRGQPQ---
 MP08974 -----LTVSIVFREEGESQPRPN-AKTYTVSITLTAT--IDTN-QLPGYLSGQD----
 MP10832 -----LNVSIAFREEEDERPLNN-GKVYNISIVLTAE--IDTN-NLPSYLSGQN----
 MP03238 ---GSGVGIYLVSMNNSPP--QVGQ-RGTYEVRLTKTSAEPVNFS-DLPRLLKMRGS---
 MP03267 -----EVSKEG--VTSS-----
 MP07032 N----DSKSFTMPLHTAQA--GQPA-PRLYTVKLTAE--VNPE-TLKRLIQGGQS---
 MP08202 ---GQTAKFDVPRDDPS--STRP-PKIYSIKIAKVAK--INPE-VVQQFVEGRQS---
 MP13872 DADGVSTQEFSVSLGNATP--GQKA-PKVYKVRVLTAKVAQ--INPE-VLERFIKGDQS---
 MP13876 DADGVSTQEASSFFAQFSRKAQKA-PKVYKVRVLTAKVAQ--INPE-VLERFIKGDQS---
 MP03288 ----VTEHFTVPYDAQVD--PRRR-PKNVRVKVTFVQE--VNIG-LLRNLVTGRHDNNT
 MP12999 --WMRHGDIVSYLEKHPEHDRLKS-AYEIASGLAYLHS--LRPM-VIHGDIKGVNV---
 MP07178 -----WEEWEE-----VE-YTRKVR-----IDSNWARSDRFKMAID---
 MP07431 -----WEEWEE-----QDRLRGRIA-----YDPNHPLPDRVHSATK---
 MP13957 -----WEEWEE-----QDRLRRRIT-----YDPNHPLPDRVHSATN---

:

NC_QDE-2 DFPKYNV--ELDALNTIVTHHARADDNVAV----VGRGRFFAIGDDLIEQVRPH-DSPL
 MP08788 -YKDYDIMPILSALNLLAAHPTRSTGGGV---MVGRNRFFF--P-TVMQAADL-GGGL
 MP08974 --RNYNIAPLLSALNLVQQQHATRH---GI---RVGRSKYFF--PLQSSQTFQL-SPGV
 MP10832 --RDYNIAPLLAALNLVQRYASQH---GV---RVGQSKWFF--PLKESQPHL-GPGV
 MP03238 --SVEVSVATNLLQLIVKQASQNHPHNA-----RSYF---TDQGMVVGSGSL
 MP03267 -----AFLHIVIRLEASIA-----
 MP07032 --SDESVLSAMTALNIIIRMKSMSDCRKTIAEQKIFSQGRFFF---SERGKASL-GPGY
 MP08202 --QDEGLTALMAMNVIRQDPVSKYPFNI-----RSFF---PGKERRPV-GHGL
 MP13872 --HDNFVLTAITALNVVIRMEPTLNHPFNV-----RSFF---TDRERKEI-GLGL
 MP13876 --HDNFVLTAITALNIVLRMEPTLNHPFNV-----RSFF---TDRERKEI-GLGL
 MP03288 LQRDNGAITAMNMLNLFVQAQPRQG-----GNLIKGRSFYMRPTRPDRSDAI-MSPF
 MP12999 -LVDDYRSCRLADFGLAAVAETQRL-----DSTTSGSI-----
 MP07178 -----DFNKNRKW---PGPQTNIRAQ-WDQF
 MP07431 -----DFNSNRKW---PPMVTGVRAL-WDQF
 MP13957 -----DFNNNRKW---PPNITGVRGL-WDQF

NC_QDE-2 VILRGYFASVRPATGRLL-----LNTNITHGVFRP-GVKLAQLFQELGLDVMDCN
 MP08788 EAFRGFYSSVRPTHNQLM-----VNVNCTTAFYK-PGNLADG---LTQFMAASF
 MP08974 MAVQGFYASVRPVYKELM-----VNVNACTTAFDLPGNMAEA---LFAFNRNTH
 MP10832 IAVQGYASVRPVYKELM-----VNVNACMSAFDLPGSMVTA---LRQFNSNSR
 MP03238 ELLRGFFQSVRPGINEMY-----INVDTSMATAAYR-PGNLVDL---CMDFMKTGN
 MP03267 -----FSSVRPTIGRMI-----INLDTTMTAVYQ-RGNLVQL---AIDFLDRGN
 MP07032 EVWRGYFQSIRPGMGQMY-----LNVDTSAAVVYA-PGPLIQL---CLQFLEIRN
 MP08202 ELWRGYFQSIRPALGRVI-----LNVDITGMFFK-PGPFINL---ALEFFGKTS
 MP13872 EVWRGYFQSVRPGMGEML-----INIDISTGLMYK-RGPLIQL---CMEFIKRQG
 MP13876 EVWRGYFQSVRPGMGEML-----INIDISTGLMYK-RGPLIQL---CMEFIKKQG
 MP03288 RLWAGFFQSVRPSINEII-----VNVDTTAGVVLV-EDWLANI---SMSYLRLTD
 MP12999 ---KGTVAWVAV---EMLDPE---DIGVDKASGDIYGYACTIYELMS-GKPPFLGREG
 MP07178 QVYAGSISSTQGEKTKKKDEEEVDDDDDDLDNDE-----
 MP07431 QIFAGLLTSIPIWKKVSDDEDDLSDDEVGSDEDQPYFHD----AAL---RPTYVNQIN
 MP13957 QIFAGLLTG-----

NC_QDE-2 A--WNEVTKNQLN---DKMRRVHKVLAKGRVELNAPFLIDGKIVYKCYRTLNGIANRG
 MP08788 G---ARP-----NAFLKGVRVRTIHL-----GYKK-----
 MP08974 G---AMPTLP-----PTLLRNIKVTTTYL-----GYRKRK-----
 MP10832 G---AMPSLP-----QNLRLSLKVTTYL-----GYKKRLK-----
 MP03238 A---RDALPAGS---HGFKLENFVKKIQVYVSSM-----KRVK-----
 MP03267 QNPRQALNLQPRT---PDYVKLEQFLKNVKIIVTTT-----GRTK-----
 MP07032 P---NSLTIEGIT---RAGWFRLQEFLKGVKVAITPA----TPGRPIRTA-----
 MP08202 S---SPSLLSPRSRPFDRERLRLQRFISGIRVKVPAA----DPRSQTRSRII-----
 MP13872 ---SPLALAPSRGFPDRERLKLRSRIFITGMRVLIHSG----DPNLPPVAR-----
 MP13876 Q---SPLALAPSRRESTDRERLKLRSRIFITGMRVLIHSG----DPNLPPVAR-----
 MP03288 A---QALRMPSNH---QNFILKEFLRGVKAIVEI-----QPGQRRRPR-----
 MP12999 A-----IHKQKISGVM-----
 MP07178 -----RS-----
 MP07431 D-PDTQTTHDGRG-----RGRGRGRG-----
 MP13957 -----GQGRGRG-----

NC_QDE-2 DERGKQKDGKEVRYPPFLGIPGVQVGGPTSCQFYLRARETKDGAAPPPTPGLPSNAYITV
 MP08788 -----TIKGMSNLTARQHSFHCE----EFGK-----KVTV
 MP08974 -----VHSIGTTSARNTFFKHD----QYG-----RISV
 MP10832 -----VQDIASTSARRTFFKHD----DWG-----KISV
 MP03238 -----TIRGLEP-NADGFSFS-----KNGV-----AMTV
 MP03267 -----IIRGLEP-NADGFIFTNR----DGD-----QVTV
 MP07032 -----VITGLTTRGAAAETVPRG----QTN-----SMTI
 MP08202 -----VVQRLSRDGARDIRFTNR----DNN-----ETNV
 MP13872 -----VVKKLSTAGANNTSFSLR----EGG-----SMTV
 MP13876 -----VVKKLSTAGANNTSFSLR----EGG-----SMTV
 MP03288 -----AIKDLVA-NVGACRFEGR----HG-----QTTV
 MP12999 -----PEKPIQGWCPDTVWSMVERCWSKEPSEPR-----ATHI
 MP07178 -----LGDA-----
 MP07431 -----RGGAKR-----
 MP13957 -----RGGANH-----

NC_QDE-2 ANYYKQRY-GITAN--ASLPLVNVGTK--EKAIYVLAEFCTLVKGRSVKAKL-TANEADN
 MP08788 EEFYKRY-RITLRY-ADKPLVDVGG--QKSNLLPAEVCEILPNQPFGRGKL-HEEHTAA
 MP08974 ENYFKKRYPRINLRYPAELPVINTGTA--KKPVHVPALCDIEPGQPYRGKL-SSKETQQ
 MP10832 ENYFKRAY-RITLHPDDVPVINTGK--NKPAYIPALCEIEPGQPYRGLL-NSEETKQ
 MP03238 GTYMKSVH-NIDLRY-RGIVGARLSGPN-EAPIIVPLEVCVVQQGQLYKKRL-PDEFTSA
 MP03267 GQYMEKAY-NLRLKF-RSIIIVRLTGPADRPEIVPLELCEVKPGQLYKKKL-PQGLTES
 MP07032 AQYFLATA-NVALTY-PNIICIEVGHG--DGISKIPMEKCSIPPGCFMRKEI-PERIQRE
 MP08202 ADYYRELNNRPLQF-PDIICALTASG----AAFPLEKCEVVSQGIARKQV-PPEVTKS
 MP13872 ADYFKKRN-NRPLQY-PDLPCVEVGAG----ALIPELCHVPPGQIVRKQV-PPEKTKD
 MP13876 ADYFKKRN-NWPLQY-PDLPCVEVGAG----ALIPELCHVPPGQIIRKQV-PPEKTKD
 MP03288 AEHFSRAY-NVTIQ--PGDLGVRIGQH----ELFPIRFCKVE-AQLYKSKLQSPKHVKA
 MP12999 ERYLQRIM-EGTASLDDFEATIGSGSP-----STSDTDD
 MP07178 -----AQSASTPTEEQNVWESSSTYA--SDEKEDK
 MP07431 -----RGVPRAPYGRSG-KELGRKPTAVANNEEQDLLIDA-RLEKDDA
 MP13957 -----RG-----GVEKDDV

NC_QDE-2 MIKFACRAPSLNAQSIVTKGRQT---LGLD-KSLTLGKFKVSDIKE--LITVVGRELKPP
 MP08788 MIRVAARPPNVNGGEIMSAGLSN---LGFSEASSVMKAFGVQVGKQ--MAVVPGRILPPP
 MP08974 MIKVACNPPNVNAEIVGDGFAK---LGITPPSTVLNNGFIRVSSE--MAVVPARELRPP
 MP10832 MIRFACNPPNFNAEIVGDGFTK---LGITPPSEAFPGFRIEVGKE--MAVVPARELSPP
 MP03238 AVGFATLRPQERLDWISARGLAP--VGDYA-RSEYIIESGMEIATQ--PKMIQKLLDMP
 MP03267 ARSFATMKPNERMSHIEGQKSPI--PEFI-LSEYVVQAQMKSQV--PIEQGKILQPP
 MP07032 FIKFASQRPDERLANI-QQCLALRGALDHR-DSEYLNADFIEVDSNAMPITIDARVLKPP
 MP08202 MVFEFSQKRPEERLRAI-RDGLNL---LQHG-QSDYVRNFGMSVGTQSFPMIDINARIAPP
 MP13872 VLDFATKRPEDRLTSI-RNGVHV---LQYG-QSEYVRQFGMNVDTASGPVKLNARVLNPP
 MP13876 VLDFATKRPEDRLNSI-KNGVHV---LQYG-QSEYVRQFGMNVDAISGPVKLNARVLNPP
 MP03288 MLDFMPRYPEDRLQTI-RQSWGA---LGHS-TSEFLRGAGISIDPT--PMMVEGRILDPP
 MP12999 VLTTYSHESDDGSPIMYKSGMEREYDSQPRSHYMVLDLPRKQEDQ--IASIDANTSHPP
 MP07178 MITFLNDP-----ARGVQVY-----LSSHMRKQGLHYADR-----NLFIIP
 MP07431 LINFLNSF-----AKSIQVF-----LSSYMRRQGLHYSDA-----NLHNAP
 MP13957 LINFLNSF-----AKRIQVF-----LSSYMRRQGLLYSDA-----KLHNVP

* . *

NC_QDE-2 ML-TYS---GNKTVEPQDGG-WLMKFVKVARPCRKIEKWTYLELKGSK-----A
 MP08788 GI-VYG---RGTPQVDDRASWNLRSVKFTIG-GTLRSWAVLLIKDNN---DRDEFQDNR
 MP08974 QL-FYA---RKSVSASNGA-WNIMNVRFHGR-AEVRSWMMVVRDSSFGSTGSSVVTGPG
 MP10832 RL-LYG---HKAVSANNGA-WNIVNSKFHRG-ARVESWVMMVVRDSAVGGTGLSLSDAQ
 MP03238 SV-MFK---EELKPQNGA-WNVLRQHNLDA-APFTAWAAITFAD-----RIR
 MP03267 SI-RFA---YPHELSPHAGS-WNVVGHQLFQP-RNLHTWAVVWFVE-----LS
 MP07032 SL-RYNDTGKQRV/TPKSGA-WNMLDAKFWKG-GTITHWVMVIYASTG-----QFT
 MP08202 RL-VYGQGSKQPSVEPRNGQ-WNMMDKKFVQP-QQINRWAVITFDS-----RFN
 MP13872 TL-RYGPQSKQPTITPRNGA-WNMIDKKFSKP-MTIFNWWWVVEYEQKK-----RFD
 MP13876 TL-RYGPQSKQRTIVSAEFV-VSLIDKKFSKP-MTIRNWWVVEYEQKK-----RFD
 MP03288 AI-RYGAREHVRINPTKRGV-WDTLNKQFKEP-QSIKTLVINMTESS-----T
 MP12999 LEGEYT--TGRTAVPRLSPSRNSIGPRF-RG-AEVRNWWWVIIRDVAAGTQGSLLVDYQ
 MP07178 KL-----LQFFINYLRNQ-----
 MP07431 RL-----ISAWLGYLTKHH-----
 MP13957 RL-----VSAWLYLEKHH-----

NC_QDE-2 NEGVPQAMTAFAEFLNRTGIPIN---PR--FSPGMSM--SVPGSEKEFFAKV-----
 MP08788 DPFLRKTIEGFVNMCKTSGMNVPEL--PKSTVTANLPPK-KLDGPTRAKAVAEIQSTI--
 MP08974 DDNLTRLRDNFAGKLRSCGMMLPNAM-PRLCVTELLPPV--MHPDRRAALEIIRRSFLG
 MP10832 DRNLLSLLNFSKLLINSGMKVPPTP-SRLVNTPALPRADKKTDPTRKAALEILRTTFRE
 MP03238 RAALESYMKSLADCCANLGMKVR---PPIKISEGAGQ--NPERALKEIIDEAARLGV--
 MP03267 EDAVKRHIKGLQQSCAKLGMFPQGRMVDPVAYRAGHGN--NPEKALQQALTEVSEKA---
 MP07032 TKDVNDVAVNTLMDECKKLGIAVENPK-PLIKYCNGQG---VVGDDLKAGLEA-----
 MP08202 MGIARQMVSIIHAFGTTGMNVIEKD-PVIHSANPQGGPSNITDALKKAGSECARK---
 MP13872 PVAAGEMVKGLMMGCVSTGMSVQNDN-PLVFWENGQG---RIADQLRSAGMRAMEAGV--
 MP13876 PVAAGEMIKELMKACMSTGMSVDNAN-PLVFWENGQG---CIANQLYSAGVRANAAGV--
 MP03288 TNVMQAFVNDLCSVMRERGMKIG-----KCTDIKEENPLRGVDEILM-
 MP12999 DPTLISLRDKFTINLRSSGMRLPDTL--HTSITPLLPAA--TPADPARKAALSTLRATFYN
 MP07178 -----VLPGKSESAALTKALNIIIEI
 MP07431 -----VFTEAEQLAALEGAKATVRK
 MP13957 -----VFTEAEQLGALEAAERAARK

NC_QDE-2 ---KELMSSHQF----VVVLLPRKDV-AIYNMVKRAADITFGVHTVCCVAEKFLST--
 MP08788 ---KSIPQKPSF----LFVILSNGDK-HVYSGLKHLCDEVYLDVPTVCVHSAKIRKE---
 MP08974 ELQKSGGQKPDF----ILVLLSHVDN-FIYPGIKRIGDVELGLNTIHLQLDKATAEG--
 MP10832 ELQAASENKPDF----VLVLLSYTDN-FIYPGIKRICDVEEGLNTIHLQLEKAMSD--
 MP03238 -----PKHL--FIVIVLPTNGA-DLRAQVKHWGDIENGVRTQCVRESKLS-----
 MP03267 ---HAAGLGPQILQQLIFLVILPQSAE-DIRRRVKHWSIDITKGIRTQCVRIDKLS-----
 MP07032 --KGQKGTLPNL-----ILVVIPANTG-TIYKQVFFGDVVKVIATQCVMSPKCK-----
 MP08202 ---NGGTHGPD-----LVVVLPDLGNTEIYRVVYKFGDVEIGVATQCLKASKCR-----
 MP13872 ---KGKKVGNL-----IVVLPEDGN-EIYAVKHFGDIKQGVATQCVKSGKAF-----
 MP13876 ---KGKKVGNL-----IVVLPEDGN-EIYAVKHFGDIKQGVATQCVKSGKAF-----
 MP03288 --HHGKVYMPDL-----TLVLLRDNAP-GEYQAVKRFQDIKMGVATQCVRWNRKIWEGYS
 MP12999 ---WFSTNKPDF----VLVLISYLLD-FIYSAIKRIGDLELGLNTACLELHEALSKP--
 MP07178 -----ALVELPLTST-----LARKLPDNFNSALKEVFKV-----
 MP07431 -----AQEELPLTSK-----LAKALSDDLNSGLSTCFGVGK-----
 MP13957 -----AQEELPLTGK-----LAKALPDDLNSGFSTCFGVGR-----

: : * . .

NC_QDE-2 -KGQLGYFANVGLKVNLFKGG-----TNHNIKTP-----IPLLAKGKTMVVGVDVT
 MP08788 -RGVQYFANVALKVNLMKCGG-----VNHGLDTAS-----MSWLKEASTMLVGIDVT
 MP08974 -NRQDQYLSNVALKINTKLG-----VNHQLDDNA-----MNWLKRRRTMMVGIDVT
 MP10832 -KRQDQYLSNVALKVNTKLG-----VNHQLDNDNA-----MNWLKRRRTMMVGIDVT
 MP03238 -KANNQYWNNAIKLNARLGG-----RNFIVRSPA-----MARFRSEPTIIMGADV
 MP03267 -KANDQYHNNVALKLNARLGG-----RNFVAGSPA-----IDWFKQKATIIMGADV
 MP07032 -GANSQYWANVCAKINLKLGG-----INFIPDSSSSTF-RAISDPRSPTVIMGADV
 MP08202 -GAKIQYWANVALKINPKLGG-----INVKPDARSAA---ALDTPHNPTIIMGADV
 MP13872 -RAKPQYWANVALKINVKLGG-----INLVPDPSSVA---VLTDPQNPTIVMGADVI
 MP13876 -RAKPQYWANVVLKINVKLGG-----INLIPDPSSVA---VPTDPQNPTIVMGADVI
 MP03288 ARNCNQHNNLVKINAKLGG-----LNHVTSHPL-----MDHLVNNQAMVIG---N
 MP12999 -IIQEPYLANVAFKINTQLGG-----VNRRLDNDNA-----MRWLNERTMMIGIDSI
 MP07178 -RKEVDLWSTLSTADE-----DASKAQLDELVDGKLEIFDQAV
 MP07431 -QKGEHVWPDVEMKEMEASGDKEKDKERKRNSLDLVDKSKKIKFTTDEGEVLVDII
 MP13957 -QKGDHVWPDVETKMEPNAGKENDKKRKRNSLDIDARQSKNIKFTTELAK-----

:

NC_QDE-2 HPT-----NLAAGQSPASAPSIVGLVSTIDQHLGQW
 MP08788 HP-----GPGSVK-GTPSIAAVVASVDYFAQY
 MP08974 HR-----GPGSKE-GAPSIAAVVANIDDFVQY
 MP10832 HR-----GSGSKE-GAPSIAAVVANDDDSFVQY
 MP03238 HP-----GPGIQR---PSVASLWSTDLASKY
 MP03267 HP-----GPGVQR---PSVTSLVWSFDQDATRY
 MP07032 HP-----APGPAMKTMPSYSSVVASMDSHAARY
 MP08202 HP-----APGTTA---PSHTALVANVDSDAIKY
 MP13872 HP-----APGSDG--RPSFTALVSNVDSDTAKY
 MP13876 HP-----APGSDG--RPSFTALVSNIDSDTAKY
 MP03288 HP-----APGSTM---PSTAALVSSWDKYACRY
 MP12999 CH-----TPRNKAESGLSVTAVVANVDEEFVQY
 MP07178 INGTSES-GWASG-GWGD-----SDSNGNAWGS GDGTNPWNTGNGSDTPDTPLEW
 MP07431 MSDANDTGGWGTASGWGNVEADPDAPGWGDSGGSAGGTWAVDDPW-AGDLAAAAGSLDQW
 MP13957 -----TGGWGNDSAGS-----SSAGGGWAGNDPW-AGDLAAAAGNLDQW

```

NC_QDE-2   PAMVWNNPHGQ-ESMTEQFTDKFKTRLELWRSNPAN-----NRSLLP
MP08788   PASMELQETK--KEMVTNLAKMMYERLQLFASKNGN-----QLP
MP08974   PASLRIQQTHEIREMVLELKEMMVERLLAYQTKSG-----SLP
MP10832   PASLRIQQTHKIKEMVMELEDMMVERLQAYRNKSG-----KLP
MP03238   CAVTNIQHPR--LERIANLEGMSEIAIKDFASRFGG-----TPP
MP03267   CATTRIQDPR--VEHIQDLGDMARTAIEDFMSANPKTGKDGK---PVIGSNGAPEPVLV
MP07032   MALLRVQR-R--QEIIADLDQMAKKLLKYHIDYQTQV--EGKS-----AAQAEP
MP08202   VADIRVQTSR--QEIIADLDGMARNLLGKYMDYRKNQ--EKK-----PNFRP
MP13872   IANSQVQTSR--QEMIDDLQQMAESNIRHYMNYRTNV--EKH-----RSAAP
MP13876   IASSQVQTSR--QEMIEHLQQMAESNIRHYMHNRKNV--EHH-----RSDKP
MP03288   FASTRVQHPR--AEIIQELTVMLEQALERFKSAN-----RVLP
MP12999   PASLRIQQDPETTGTISHLKD MIVERFQAYRAKNG-----HLP
MP07178   ---QIPDPP-----TLFPFLG----PTTLP
MP07431   ---HIEQPS-----LWPLL G----PTALP
MP13957   ---HIQQPS-----LWPLL G----PTALP

```

*

```

NC_QDE-2   ENILIFRDGVSEGQFQMVIKDELPLVRAACKLVYPAGKL----PRITLIVS-----
MP08788   QRVLVYRDGVSEGQFQIVVDEELPAIRAAFAKYDRPGA--RYNPLL TIVIC-----
MP08974   ERVVFVRDGVSEGQYDTVLSEELPQILEAFNRFNTRERKTPYRPLLSIVIC-----
MP10832   ERVVFVRDGVSEGQYDIVLKEELLQILD AFKKFKTKGAKEPYRPRLSVVVC-----
MP03238   SRIFFRDGLSEGEYEKTAQEEIKMLENIWKVKHSDKF--PKPPKLT YVIV-----
MP03267   QRIVFFRDGLSEGEYDGVAREEIKALKAVWEQR-----GVRIDLTYVVV-----
MP07032   KRLIFYRDGVSEGEYQQVLEKEVLLLRQACVDL-----KIYPKITFIIV-----
MP08202   TRLLFFRDGVSEGQYTQVKDQELEVL RDVCTEM-----GINPQITFIIV-----
MP13872   TRIIFYRDGVSEGQFAQVLEQELPRLRAACEEL-----KIKPKITIIV-----
MP13876   TRIIFYRDGVSEGQFAQVLEQELPRLRAACEEL-----KITPKITIIV-----
MP03288   RSIYFFRDGVSEGEFEKVRQYELEAAKAYLQEKYTREKC--PRRPTITFIIV-----
MP12999   ERVIVFRNGSKPN--DMVL YKELPIILEAFEYFGSSEC--PYRPLLSLILCPKPLGVQYQ
MP07178   ---MTHQIGIVEWSVKKVM-----KITPPVA-----
MP07431   ---LTHDTGIVEWSVRRVV-----SITPSVG-----
MP13957   ---LTHDTGIVEWSVRRVA-----SITPSVG-----

```

*

```

NC_QDE-2   -----VKRHQTRFFPTDPKHIHF---KSKSPKEG---
MP08788   -----GKRHHTRFYPTDAQNADD----KGNPKAG---
MP08974   -----GKRHHARFYPTSAESADF---KTKNTKPG---
MP10832   -----GKRHHARFYPTDAQNADP---KTMNTRPG---
MP03238   -----GKGHHLVFFPGSRNPADD---GKGNCRAG---
MP03267   -----GKRHHIAFFPDRDSYAND---GKGNAKAG---
MP07032   -----GKRHHARFFPNDRRDAD---KSGNCPAG---
MP08202   -----AKRHHFRFFPPADGRTPD---RSGNCPAG---
MP13872   -----GKRHHVRFPPSTSQDQDP---KSGNCLAG---
MP13876   -----GKRHHVRFPPSTAQDQDH---KSGNCLAG---
MP03288   -----GKRHHFRFFPNTGDPTTD---KSRNCPAG---
MP12999   DRPPSPPVSILKQPNAAPLSSKQIHWGRNGPVSF GPARPKVSEPCRFQIGKCRYGDGCR
MP07178   -----PGGPTRK-----FKASSEGDYGD AEAIES-----
MP07431   -----TTLK-----GKSHS-----PVEA-----
MP13957   -----TTTLK-----VKSHS-----GVEA-----

```

:

```

NC_QDE-2   -----TVVDR---GVTNRYWDFFLQAHASL
MP08788   -----TVVDR---GVTAVYNFDFFLQAHGGL
MP08974   -----TVVDK---GVTGVFDFDFYLQAHAGL
MP10832   -----TVVDK---GVTGVFDFDFYLQAHAGL
MP03238   -----FVTDQ--NLAIASALAPDFYLM SHQAI
MP03267   -----FVADT---ALASPLAQDFYLQSHAAI
MP07032   -----TVVDT---EICHPTEDVFYLQSHAGI
MP08202   -----TVVDT---GITHPIEFDFYLQSHGGL
MP13872   -----TVVDT---TIAHPTEFDFYLQSHGGL
MP13876   -----TVVDT---TIAHPTEFDFYLQSHSGL
MP03288   -----FVVDK---NISHPIYQDFYLV SQAGL
MP12999   FLHVLAENHVSSDREGTPASPHLNHVRRASRDDNYRNK---GISGLFQLNFHLQV NAGD
MP07178   -----ELIRKLARVELVSWL GWEDDTMDPEGV
MP07431   -----ELAANFYQVKLAPWLK WDDGMLEDEGV

```

MP13957 -----ELAAKFCQVELAPWLNWDDGVREDGGV

NC_QDE-2 QG--TARSAHYTVLVDE---IFRADYGNKAAADTLEQLTHDMCYLFGRATKAVS---ICPP
MP08788 QG--TTKPTHYYVVHD-----D-MNLSADRLQKLTNDVSMFMSRATKAVS---LVSP
MP08974 QG--SVKATHYIVYD-----E-NRFAADEIQQGVNSNSYLYAKATRAVS---LIPP
MP10832 QG--TVKSTHYIVYD-----E-NRFAADEIQQGINDSSYLYGRATRAVS---LMPP
MP03238 LG--TSRSSHYILLRD-----D-NNEGIVGIQQLAFSLCHVYAKATRSVS---IPAP
MP03267 IG--TSRSSHYILVD-----E-NGLGLQHLQELAFSLCHVYAKATRSVS---IPAP
MP07032 LG--TSRSAHYTRIYD-----E-NNFEVNFVQDLSFLLCHLHARSTRSVS---LPAP
MP08202 LG--TSRSAHYHVLHD-----D-FGYTADALQSLCYTLCHFARATKSIS---IPAP
MP13872 LG--TSRSAHYSVLYD-----E-NNFSADALQSLSFALCHVYARSTRSVS---IPAP
MP13876 LG--TSRSAHYSVLYD-----E-NNFSADALQSLSFALCHVYARSTRSVS---IPAP
MP03288 KG--TSTPGHYTVLED-----ENLENGDRLQQLAYSLSCHCYARCTRIVK---IPAP
MP12999 TI--MIQYANYTVIYD-----E-TRFTVDELQQETDENSLLYAKATYASTN-GLMPP
MP07178 VPRIMERSAGAVVVQDK--VVFEGD-----AKARVAVDAISVYNP
MP07431 LPRIVSNSKGVVVEKAGEVVIKED-----ARDTVSV---VDKP
MP13957 LPRIIGNSKGVVVEKAGEVMIEGD-----ASHTVSV---VDKP

:: : : : *

NC_QDE-2 ----AYYADLVCDRARIHQ--KELFDALDEND-SVKTTD-----FARWGN
MP08788 ----AYYADLACERGRICYI--HQLLQ-GNTSVNTSSANA-----EQQVLNEATKSW
MP08974 ----AYYADQACERGYYL--QDFLT-GES-DTASSAGRGALAREAEKQRVFEAAKKAW
MP10832 ----AYYADQACERGYYL--HDFLT-GEEKDKTGSKGKTPAKEAEKQRVFEAAKKAW
MP03238 ----VY----CKFVYFIVH-----
MP03267 ----VYYADLACDRLKFHI--AHNDKRVNHS DSSIVGDE-----EEFNLDLWRAAY
MP07032 ----VYYADLVCTRAQNHY--DPSAP-PNPDP-----QSDDPIKPYRDAF
MP08202 ----VAYADLVCGRARNHY--SQDLQ-SEVGS---TRDG-----GSTELEAMRADF
MP13872 ----VYYADIVCARAKNHY--DPAGS-VNLSD-TFTTDS-----AEATLESYRQSF
MP13876 ----VYYADIVCARAKNHY--DPAGS-VNLSD-TFTSDS-----AEATLESYRQSF
MP03288 ----VYYADLVCGRARFHY--DEQ---VFRSDDASVRSG-----EEFPIEYFKSKF
MP12999 ----SYYAHQACKRGKYLLSKEFTD-GAKMDGSSRRDS-----NAGGFEEAARSPL
MP07178 SSGLAAY-----QPISD-----TITILVEPHVVEHLRTGM
MP07431 QPG--AH-----NPLTD-----NITIFLQPSGVEHLREGM
MP13957 QAG--AH-----NPLTD-----NITILLQPSGVEHLREGM

NC_QDE-2 S-----GAVHP-NLRNSMYI-----
MP08788 N-----RGVAGPQLKDTMYL-----
MP08974 G-----QGVHT-DMRNTMFYI-----
MP10832 G-----KGVHS-DLRSTMFYI-----
MP03238 -----YFL-----
MP03267 -----APVNG-NVLRSMYFI-----
MP07032 -----KETND-VQLKKMYFMVGL-----
MP08202 -----RPIHR-NQERRTFFT-----
MP13872 -----QPLHP-TQQRLMYFSVSVFFGFLGWLTDDFFSEVFFFGL
MP13876 -----QHLHT-RQQTLMYFS-----
MP03288 N-----QARTS-VQKRGMYFV-----
MP12999 G-----DSVHP-DLKNSMFFI-----
MP07178 GIGGTWQQLRRGDLVEDEVPAKSKKAKNGDRFWYMEDMV-----V
MP07431 GLGGTWVQLVRSGD-----AKKKKKKNEGKFWYMDTLT-----V
MP13957 GLGGTWVQLVRNGE-----T-KKKKKNEGDNFWYMDNLT-----I

::

NC_QDE-2 -----
MP08788 -----
MP08974 -----
MP10832 -----
MP03238 -----
MP03267 -----
MP07032 --ISLHTKPLMNAT-LVNHFNFPPSILVV
MP08202 -----
MP13872 LHPSVHWAVVVVVVFLVRHCSF---VVLM
MP13876 -----
MP03288 -----
MP12999 -----
MP07178 TLTSYHIV-----

MP07431 TLTSYHAIY-----
 MP13957 TLTSYHTI-----

RdRP

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.427)

NC_RdRP_QDE-1 MNPITPRKRNSPVVEIINRLNNDYNLGLQCVADTTLTPHRRKELAESDEDFGRHD-KIYR
 MP08656 ML-----
 MP00604 MS-----
 MP02213 MSQ-----STDY-----FNSSDDELIR
 PB_RdRP-2 MS-----YRKQ---TPMPFQKHG----
 MP11137 ME-----IFIRNVDFFTSQHDITR
 MP09882 ME-----VFMSDITYSTNTNDVIR
 MP02297 MD-----LNIKYLPNDVNDWDLTR
 MP10417 ME-----INIANLPFSLTRSELTQ
 MP15899 MP-----PEYTL-----RQNLTIEDTSWS-----

*

NC_RdRP_QDE-1 ALNFLYWRKDDSL----NQAEANFFIEAKAASSNWVP---KAHADPDTLPWSKEPPRAA
 MP08656 -----
 MP00604 -----
 MP02213 RVP-SVLLGPKNDKGASPNKGRIPPR-----PVTGPSNTDPDLLERTKRGDATA
 PB_RdRP-2 ---SYNRSRGYM----SYLVTNL-----DHQTLPS-----
 MP11137 TLA-SHLHESPYT---TGAPLNF-----HVRMF---KPRKKGDRHLH
 MP09882 RLA-SIFHGPGYAGLF--SNLPLNF-----NVRLFDPDTP--RRGRRNH
 MP02297 IISKAILHNDDFLPKDPDARRINF-----QAKVNPS----LAGGVRN
 MP10417 KLAEDILHKDDFLPLPSPEARINF-----DVKLQPN----RAGGAGS
 MP15899 -----

NC_RdRP_QDE-1 TAGQQWALQTVLLEVLNRFM-----PPNNTPGRTFGRTLSPGLSRPTSTNTK
 MP08656 -----IESPPKTPK-----
 MP00604 -----
 MP02213 SSPRWLAAPLN--PNGDSSRIEF-----PPSLPQQLN-----PSSLKHASPLLDK
 PB_RdRP-2 ----TIYSVFQKFGNVNRVELG-LNGNECADGTATVQFVQSPQNLNNGIKID-GR
 MP11137 QGCGALTLPTE--EVGRMFLVQYG-----GAGPRSYVSIRGRKLAFLSNRALSLDILI
 MP09882 SGKGLLTLHSV--ELGQKFLLEYGELNG--GPPPTQTVLFGSRRVKFFPSNKHARPDIVR
 MP02297 DGTGVLTLPSA--GIGHRFLDWVK-----VNPLKIRGNKIKFYRKWEPFRHFLVM
 MP10417 NGQGVLTPVK--RVGARFLRWVQ-----GEPLEIEGRLIRFYRSRSPSTKYFAS
 MP15899 ----FTIPQ-----

NC_RdRP_QDE-1 RKDEPANVTFADP-----PKRSLTRSATGPPHGAAPLKFDPVNTGSKR-----
 MP08656 -----FKPSLRP-----
 MP00604 -----
 MP02213 RKEKA---RAIPQGLESTRALSKTNSAEDSMHVIKDPALLKEVV-----
 PB_RdRP-2 AVKIE---PNLDFSPRE--NRYGKPMNKIRFQSRFSMGTMVKPDK-----LVEHWTT
 MP11137 SIQNS---PYLDPAALEERERISKLLDSNPISLARLQFGWDCRDHV-----FSVEWDF
 MP09882 KISKE---PYVDPAALEEKERREQFTASTTVEITSLSFGWECRDYV-----YSSEWEL
 MP02297 TLLRT---PFADP-DIEEAHANKVFLDQDKLRVDIVQFVFFKPPGA--SSVREYSVEWQH
 MP10417 NLERT---PYLDP-KLEEKHSKIVRDLEYGLPVNSVEFGLFVRPSVK-GKGR-PSIEFSV
 MP15899 -----HYLSP-----

NC_RdRP_QDE-1 ----PSLESENLNQCTKRAKGLSDNVAAA-----AAPPVPIASALDKVPTRR
 MP08656 -----
 MP00604 -----
 MP02213 ----AKQGRGLSTPQKARVMTTSGTSTR-----SRSRIPFKVSKEHKDRVY
 PB_RdRP-2 Q---NNCALIINFDMRQYHIFFDHGNQK-----YRAEFKFKELLDIVELER
 MP11137 PCL--HGSALRFDAENRRICLQARVQRTNPLADILGFDAETFTPLPQEVLVHFSTISY
 MP09882 QCV--PAAELSLNDRRELIRFEHT-----SYPSGRLAIAVQLSSILQ
 MP02297 DYAKTSTAWLKFYGHKLIRIMLGNP-----MTEEIGYSIAINFASIQK
 MP10417 ECSVRKQASLFFDYDRKVIKIAMSDS-----SAGSSKEHVLIRFADVLR
 MP15899 -----

NC_RdRP_QDE-1 HA---NTRDPTATGHRRADQVDSFDTSQGTSYGSSVFSACRHNQSTT-----QSS-FEA
 MP08656 -----
 MP00604 -----
 MP02213 DI---SDSDPDVTMQLVSD--SSDESQDSLFDKNDPPGSAATSRTTSLASVNNT-TKL
 PB_RdRP-2 EE-----NTWYF-----TFQLRYPARFWRQNPNAIRETKTTLVADSQWERVVKI
 MP11137 ITCYRDSSGNTIIHL-----TLSTPPQFIQ-----GQPTFLDKPVPS-LRY
 MP09882 AHTYLYHTKDPVIFL-----SLDHAPSFEAEP-----GTPGSLRQRLPF-LPI
 MP02297 IG---VGYDPAAYV-----CFDTLTPPIFECEE-----FHRTLGTDERQDN-RKY
 MP10417 VY---VNCSP-DYL-----IFDTAIPASFEHED-----IYRATIGDDRVDN-RKY
 MP15899 -----

NC_RdRP_QDE-1 P-PSQPREKRPVDATVFEAGH---LIESPSKGRRTTKSHIDNQLSSSSQGETS-FSTYY
 MP08656 -----LDASVDTR-----
 MP00604 -----
 MP02213 P-RKRSSTERPKSPSTVRAPK---IPRTPSQNSP-----SVCRELTTSEKA-----
 PB_RdRP-2 PMETSGSTTAFKGVTLNESKKTPTLILPPGMIQLG-SWL-VYRLKMKVTPDQK-DSFYN
 MP11137 PFLRLSDADR-----RPHSEIA-PYL-SLELRLVCHTLTQ-LAMFE
 MP09882 -----PGHERVA-PFT-SESLRLTCRSED-LRVFK
 MP02297 K-HRVGSLN-----AGHARVA-PYCQKLRLVLYDRGEHDVIDHFR
 MP10417 K-QKIATLN-----ASHESIA-MYCYSVGITLHRDGPDPVVEQFC
 MP15899 -----PNPNPL-----FG

NC_RdRP_QDE-1 E-----SFPSSGGEGAIPEPSRNLAR--SEESARSQVQVHAPVVAARL
 MP08656 DTKR-----RRLDSQASVLE--TENGIKPIIIASDP-----
 MP00604 -----
 MP02213 EAGRLLPSP-----NAPANRGPASERADSDHSVLERIWSNVSLPTCVIVHDT-----
 PB_RdRP-2 QLQMAANYNVLRDFLDTPS-----GLHLKIIASNT-----L
 MP11137 ELAAEAGLNIPIQN-EFYP-----VAKRGLFS-----AASL
 MP09882 DLGRTAQMH-SIRD-YEHP-----LERRNLFS-----REIM
 MP02297 KLCKIAELA-DSL-IQLPRTS-----NIVAGGHGLFD-----GRLL
 MP10417 KLSRLAGLP-NERI-VEEK-----IEVLGYRLFSKPRLGIPL
 MP15899 KCIR-----FTQP-----

NC_RdRP_QDE-1 RNIWPKFPKWLHEAPLAVAVEVTRLF--MHCKVDLED-----
 MP08656 -LQPLFQKYR--TPPAVQYEIARLLSAKNKDSVQRFVEPLLQIYKFTNS-----SNKP
 MP00604 -----
 MP02213 -QVQRLFDNPKTCVWGWTQFALARGV--LNGDWTWENIVDKIPQLCGPDGE-----
 PB_RdRP-2 PRRNTHLERATM-FPYDVLYMLESVI--LNHYFDE---INLDQDFYDMIKE-----LPH
 MP11137 SAFFEWIKR---LDFHVAFQIERLL--LEGCIDPTEILELQEDIDGLVEAARRRGTHKG
 MP09882 EILSLNFQR---ASWPVAFQLEKLM--RELILDPOEMIRIMHHILRMTRD-----HGP
 MP02297 YNLRNNFKR---FDWSIAFQLEALL--YNCLLHTGEITELLPRIHKLYEG-----HTD
 MP10417 RKL RHGFQS---FDWPTVFQLESLL--FHGILHTSEIDEISNRVLKLYKE-----QPK
 MP15899 -----KLVFQIQKFPY-----

NC_RdRP_QDE-1 -----ESLGLKYDPSWSTARDVT-----DIWKTLYR-----LDAFR
 MP08656 NLDGVAKLHAHVNVNHDGRRISEKEYLAT-----APWSEL----DLEERVLS--RNQLG
 MP00604 -----
 MP02213 ---KMHLVPHIMLGHSQQVDNSTGLE-----LDREQASII--ENKGR
 PB_RdRP-2 SI--TCGILEIVSNSKKRVWDPDTEFR-----KIWDTLRMKVCHKRKI---PDHCT
 MP11137 DY--IAMVFRDFGQQAYELCLSKSGVQT-LKQCFQKVKRTH-DRLSNTALVTSRDDDGI
 MP09882 RH--TSKFLKHFGQSLDRMW--RDGLDGTVEECFLAELKSFADQVKAPSLIPS--EGSLF
 MP02297 DHFYVSSILREYARALDRSSKENPFQ----CFERVLSKF-----NPIELKL--SRGNF
 MP10417 DS--VAALLRTFNSHIPYLTGETAVG----CFEELTSAA-----PSSLLNL--PLGQF
 MP15899 -----

NC_RdRP_QDE-1 GKPFPEKPPNDVFTAMTGNFESKGSVVLSAVLDYNPDNSPTAPLYLVKPKPLMFEQGC
 MP08656 GVGHTALAPQEIEIFGNKLLPNERATGLYYGGKIDFIGRVEKERGLYRIRLERASKGSPN
 MP00604 -----
 MP02213 GLG-----LKGHWGGEENWYGGKQVQFV--VSFDWKNQKFQLENVEMKRST
 PB_RdRP-2 MMRKLVVTPTSIY-----IQPPSLETTN

MP11137 LCMHVQITPTGMI-----FDGPIPERSN
 MP09882 DSLHVTITPTTMY-----LDGPFPERSN
 MP02297 GCYHVTFAPTSMI-----LEGPYPTQSN
 MP10417 NCYHVTFTPTMRI-----TEGPYPTQSH
 MP15899 -----N

NC_RdRP_QDE-1 RLTRRFGPDR---FFEILIPSPTSTSPSPVPPVSKQPGAVEEVIQWLTMGQHSLVGRQWR
 MP08656 KAKRRFGSRN---FLKIKIPLGLFK-----NQDDIDKCFQRPFVLWESVFR
 MP00604 -----F-----LLRPFVFCGNIYR
 MP02213 RFARMLGSRR---LLQVRVGKYSSS-----DAIDVKRLLSRKFVNLNGRVFV
 PB_RdRP-2 RVIRHFRAITDR-FIRVQFCDDGMNRISASHTGLSN-NEVYDRIYKVLTNIGIQITRRYD
 MP11137 RVIRQYKSEHHHFLRVSFNDEGRLLQFNREIDGD-DFIKRRVQPFREGLRVAGRVFY
 MP09882 RIIRSYDRKYHECFRLVSLDEGSMQYRFDRMDGP-GFIRNRVKGKLLLEGLTIAGRKFT
 MP02297 RVIRRYEGFEHH-FIRVDFRDEDRLQYRWDREVDGT-SFLEERVGGILKNGFDLGGRRQFE
 MP10417 RIIRRYKGFEDH-FIRVDFCEEDRTKYGDDREVDSDI-PFLKGRVGNILKRGFPLGGRHFQ
 MP15899 RILHEDDPLK---FVLCSFGD-----LRFPETPLR---TTGEYIHRVLKGGVWLNQVYR

: : :

NC_RdRP_QDE-1 AFFAKDAGYRKPLREFQLRAEDPKPIIKERVHFFAETGITFRPDVFKTRSVVPAEEPVEQ
 MP08656 AFL-----GKEDTVLLVRTNETYCGGRFGT-----DMS
 MP00604 AFY-----EKDKTVFLFRTNELSVGNSISST-----RAV
 MP02213 PLP-----PKDDAFYLVEINEDYERSGISA-----LGD
 PB_RdRP-2 FLAFSNS-----QLRDHGCWFFAPTGD----MTA-----S
 MP11137 FLGYSQS-----ALKEHAVYFMAFQDQDK-QITT-----A
 MP09882 FLAYSQS-----ALKEHAVVFKPFQDPRLGRVDA-----A
 MP02297 FLAYSQS-----ALREHVVWFISPFNHPIEGFVNG-----N
 MP10417 FLAYSQS-----GLRSHSVWFMSEFHHPLEGLVNA-----A
 MP15899 FYGHSNS-----QLRSRSCFLREANGDEEL-----D

: : :

NC_RdRP_QDE-1 RTEFKVSQMLDW-----LLQLDNNTWQPHLKLFSRIQLGLSKTYAIMTLEPH
 MP08656 STSMLEYFISW-----FNPPKNNDKQVLCKWSSRMALLWSSSVPGPQLLHK
 MP00604 PGRSLADLFLEF-----HNPLGLNSKQTVAKWASRFALGLSTSAPGLKLVK
 MP02213 NLRKSLGWVVLNW-----HNPIELNANQPIAKYFARIALGLSPSIPVFEFVK
 PB_RdRP-2 MIRDWMGRFSH-----VKIVAKNATRMGQCFSSTRPICQLNKE
 MP11137 SVIESLGSFADL-----PFDSKLIYCPARYAARISQGFATDPT-TTEVE
 MP09882 AIIQIGTFAK-----DPDLIRCPARYAARISQAFTATDAT-EVEVE
 MP02297 TIRDSIGDFKNL NESDYTEEDKAFDFYKDKLKLKQPSKFAARIAQAFTATDPSVKIRRD
 MP10417 KIRDSIGDFRDLRIEYEQERR--FYQADQDLLRHPSKYGARLGLAFTATRPSVIRRD
 MP15899 QRLYGLGDFER-----IMNVAKRAKRIGLLFSEAQVDYQLDPR

: : * : :

NC_RdRP_QDE-1 QIRHHKTDLSPS-----GTGEVMNDGVMGRMSRSVAKRIRDVLGLGD-----VPS
 MP08656 NI-HFIDDEMS-----CEGSDMTDGCDFGNLSLFAIREKFGLEE-----LPC
 MP00604 NI-HEIEDIIS-----VGGEDMTDGSFGINQAALRLLQNKFKWDE-----WPT
 MP02213 NI-EFINDEVVPSDNP GKPPSEKILTDGCGLINAAAMRLVADSISLVP-----VPA
 PB_RdRP-2 DV-ERIPDVER-----NGYTFSDGVMISPALAREVAATMELKH-----VPS
 MP11137 NIVLDLPDIESTDKN---GKKQIHTDGVGTMSPEFARSIIAERQSRRRGRRRPLSEYAR
 MP09882 EI-LPSNDITTVD-----EEYSFTDGVGTMSRELAQEIWKELKATKRRSRRNRT-KVA
 MP02297 QW-EMVEDLGE-----EPYLATDGVGTISESLADEIWDALCKDRTEWYRSRYVRPS
 MP10417 QW-DIVPDIEG-----DKSRLFTDGIGTISEELGDEIWEMLHEDS-AGFDSSSVKPS
 MP15899 YI-IDIPDIKI-----GDELFSGCGLVSKRLAVMVMKQKIIIFRGVRY----TPC

* ** :

NC_RdRP_QDE-1 AVQGRFGSAKGMWVIDVDD-TGDEDW-IETYPSSQRKWECDV---DKHQRTLEVRVASE
 MP08656 AIQCRVAGSKGMLLYHEDKEDNGSPQ-VWLRKSQRKVRYPISLLEDPSHRTIDVLRVSR
 MP00604 AIQCRVAGAKGMLLQHPDN-GNHEPE-VWIRPSQTKIRYSNN-GEDECRLIIDVLRSCHS
 MP02213 AIQARLGGAKGLWILDPHD-EDPLPK-IKIRNSQNKIQYKEL---DRSHRILDLLAISRP
 PB_RdRP-2 AFQFRLAGAKGVLTVASGL---TGRK-VKLRPSQIKF-----DSDHLVLEVIRYSTS
 MP11137 VLQIRFLGSKGVISVDHTL---SGKT-VCLRPSMVKFL-----GTPSKRIEIAKVFVK
 MP09882 AYQIRLMGSKGMLSIDYKL---KGRV-LTLRPSMIKFK-----APESNNVEIARAFDR
 MP02297 AFQIRFLGFKGMVAVDRELDKHEGKIRMRLRPSMRKFSN-----RSVVEADIEIARAFER
 MP10417 AYMIRFLGFKGVVAIDKHLGKQGQGNIRMRLRPSMRKFG-----KVTDEAEIEIAQSFER
 MP15899 VYQIRYLGKGVMLLHPAMDKAKSHL-AEFRKSMKKFT-----TTHNHTFSVVDYSKP

* ** : *

NC_RdRP_QDE-1 LKSAGLNLQLLPVLEDRARDKVKMRQAIGDRLINDLQRQFSE-----
 MP08656 RSPARLSIEVITNLHHNGVPASVFTNFL-KSNLEGAVLPMLAWDLKDPDAMIKLWHTIE
 MP00604 RSSCVLGTETIINMAENGVPKQFFKLL-DEGFDRILITSLTTWEGE---DAMYNLWATVA
 MP02213 FATPSLSKQSVMNHANGVPSRIFKELM-RVGVAEITDSLTAW--GRDCRDMALKDVTM
 PB_RdRP-2 -IPAYLNKQIITLSALGVEDNVFLTLM-DDMLKTLNSMLSN-----
 MP11137 PGMFYLNRPILMLLEGLGVPYPSFLKFQ-DMAVADAERSIES-----
 MP09882 PMNFYLNRPILMLLEGLGVPYETFEKYQ-DKAVYEVQQATKN-----
 MP02297 PNKSYLNRPVLTILEDQRVKKQAFDILL-DLAVADVYTIEDS-----
 MP10417 PNRAYLNKPLIMILEDKGVKEKVFMNLL-NDAVADVYRSDDT-----
 MP15899 YAFGRLNNDIIVLLSSLGVSNDTFLEKQ-REYHGWIREALLD-----

* . : :

NC_RdRP_QDE-1 -----QKHALNRPVEFRQWVYE-----SYSSRATRVSHGRVPFL
 MP08656 QTENVLLARRARQSVTDIRFRGFNDKEKDEDLDEDDLDENNGGQQHSTAWWPD---PN-
 MP00604 RLGGVRAARVARAQAGLARVLGYSESDAQDD-EDEDGLDEEE-SEESSVAWWGD---EI-
 MP02213 HVSGVSAARAARIAGTLSRALGYSGRSKDSV-QSNIDLQAE-AEGTPPERMINGRCPD-
 PB_RdRP-2 -----PSEAIKVLNSNIDE-----
 MP11137 -----FSRACSFLEGHGL-----
 MP09882 -----LADAIRMLETFGL-----
 MP02297 -----LEASSGFMRDHSL-----
 MP10417 -----LERSYSFMKAHSL-----
 MP15899 -----PIKAFMFLSADEPE-----P--

NC_RdRP_QDE-1 AGLPDSQEETLNFLMNSGF-----DPKK-QKYLQDIAWDLQKRKCDTLKSKLNI
 MP08656 SHCPSSLAETVMELAAAGF-----TPQG-CLFMRNKIFQLMKSQIRRKCSKQNF
 MP00604 SGQPSSLEETVMRLLDAGF-----DPYT-CSVLREKLSAIVTTHIQNYGAKYRI
 MP02213 SGLSESWGEIAGEMLQSGF-----HPLD-CAYLAEKIKHVLRKAIEDLISNCKI
 PB_RdRP-2 ----FGTTQTMIRMIQAGF-----MDKK-DPYTVNLLNMFRVSMLKLNKKTKI
 MP11137 -GASFRIPSVLTLNPKLGV-----FALSEDTFYQKFMEYGRNHVLRLLKHRARI
 MP09882 -GTSFRLTSVMLNLSRLGI-----NNMDWDPFYQMLQFAVHHVLRMLKNRARI
 MP02297 -GTSFNIPWILKQLHQGRSYIGTHSPSKSSVNID-NPFLQQLREVGRMDVLRKIHGARI
 MP10417 -GLNYRLAWILEQLERLGGCIGSQPDHR--VNID-YTFLKDLRKAQSSVLREIKNDARI
 MP15899 -GLAE-----RVLLDGL---DDPHIQ--SAIR---RKQMKEVASFKGERTNKDRTRM

: * . : :

NC_RdRP_QDE-1 RVGRSAYI--YMIADFWGV-----LEENEVHVGFFSSK-FRDEEESFTLLSD
 MP08656 DVPMSAGA--FAVPDPYGV-----LEEQIHFKSSRREFLRPNGLMVDTLE
 MP00604 EVPMSGMT--FIQPDPLGV-----LEEQIFYKSAHRNLPVTDGHFTDTII
 MP02213 PLQEGQAFQGYVIPDPFGV-----LEPGEIYRSSTGWIDPATRRMHFNAV
 PB_RdRP-2 NVPEGAF--LGVMDTGS-----LQEGEVFCQVTEP---SAQSSRKRIIT
 MP11137 PVPGAWN--VGIADHRY-----LRPGCIFVCIKPI----DQSRPIYLE
 MP09882 PVPGCWTL--VGADVHGH-----LEEDEIFACVKPV----DKP-AIYLE
 MP02297 PIPDSYLL--VGVADEGPAYEK---GYEDVYTLPEGHIFACIQRP----DDPEPIYLE
 MP10417 PIPDSYLL--VGVADEGPAYRDREDLASESIYELREGEIYACIQUET----GDSEIRYLE
 MP15899 IIPKSRL--FGVCDPFGV-----LKEGEVYVRITG----RGGVSTLIY

: * * . : :

NC_RdRP_QDE-1 CDVLVARSPAHPDSIQRVRAVFKP-----ELHSLKDVIFST-----KGDVPLAKK
 MP08656 GPVLITRNPKVPTDVQKVTAVSHP-----KLNNIVNVVVFST-----KGKRRLLIDF
 MP00604 GPVLVTRHPCKLPTDVQRWDAVDCP-----QLRDQTGIIFFSI-----KGRRAADY
 MP02213 GDGLVWRYPLRLPSDIQKVVDVDRP-----ELSIFQDVIVVSSKPIIDPNMGLISIMSI
 PB_RdRP-2 GDIVVYRNPCFHPGDVRRVNAVDCP-----KLRHLSDVVVFSS-----QGYRDIPSM
 MP11137 GPVLVSRSPTIHPGDVQIVTAIGAPPPGSPFEQDDLALANLVFST-----TDDRPLPSC
 MP09882 GPILISRPIIHPGDVQVVAIGKPPPEGSCFAHEPLPNTVVFSI-----KGARPLPSF
 MP02297 GRCTISRSPVAHPGDVQTVHAIGKPPPTDKLCLFAHMKNVVVLPSS-----RGKRSLASK
 MP10417 GTCAICRSPLTHPGDVQRVQAIGKPPAGKRCFFAHMKNVVVFPSC-----KGKRPLPSC
 MP15899 GDVLVVRNPCLHPGDCKLRAASCK-----ELAHLTDCIVFAS--VAR--PGRHAAPSM

: * * * . : : . : .

NC_RdRP_QDE-1 LSGGDYDGDMAWVC---WDPEI-VDGFVNA-EMPL----EPDLSRYLKKDKTTFKQLMAS
 MP08656 LAGGDYDGDRTVPV---WDPQI-VDPFTNA-DEQFSKEPPDVEAFTLENTLSVKDFNTQ
 MP00604 LGGGDYDGDKALLI---HDPST-VNPFVNA-DICFADPRNDIEKCFVKGTGKLLLELVVE
 MP02213 LAGGDHDGDTVSLI---LFAPI-VASFRSQ-PYTM---NPEPIEKYFKKEVEQASQFVTR
 PB_RdRP-2 CSGGDLGDYDIY---WDKRL-LPPTRYTPMDY---EPEKPLQVDE-VHIS-----
 MP11137 LGGGDLGDGEYNIPLNLTPEFWIDRNRIQIPGEY---PPAKRRELKRPCTMD-----
 MP09882 LGGGDLGDGVNLIPLSVLTFE-TPANTYQ-PAEY---KKAEEKMLNRPSTMA-----

MP02297 LGGGDLGDLYDVI---TYPEL-QPPLDNK-PMSY----EAGETLTLKEDRTVEP-----
 MP10417 LSGGDLGDYMIYI---QFPEL-LPPKHDS-PASY----EAPKAQLLSRKCNE-----
 MP15899 SSGGDLGDKYFVC---WDPDL-VPSIVAE-SYDY----PPNKERPSKS-VSRA-----

*** ** :

NC_RdRP_QDE-1 HGTGSAAKEQTTYDMIQKSFHFALQPNFLGMCTNYKERLCYIN-NSVSNKPAILSSLVG
 MP08656 AAECQKAKLEIAVDLQHYLLGGLRDPHLIGTYSFIHEKCIYVY--GYEHPITVANAYKFC
 MP00604 HAPTENPLACIRALQGFLGGLRNISRVGQYSNMHDYCTVTK--GLTHEDTIRMAHMFC
 MP02213 LQAMESTDAQVFLSACFL--GLKD-TRLGKISIFADTARDAC--GYSSHNHIVLTYIFN
 PB_RdRP-2 -----HILKFYINYMNN-DNLGQIANGHLATADMAFDGALNGSCKRLAQLHS
 MP11137 -----DVADFVMEYITH-DVLGMVSNWRILADQT--NIFNPDCMKMAALHS
 MP09882 -----DVAEFVMEYINS-DLLGIATNWLIIADQSQQGVLDPCDLKLAELHS
 MP02297 -----RDICDFIVNYINS-DVLGLLSDRLLVIADQSKDGIYDRDCEKLAKLCS
 MP10417 -----DVCDFVVTYIHS-NVLGLLSTRLLTIADQSTYGIYDRDCLKLADLCS
 MP15899 -----DLANHFAAYNNS--GLARVAALHAKWVRGSPKGALSTECQELNALHS

:: :

NC_RdRP_QDE-1 NLVDQSKQGIVFNEAS--WAQLRRELLGGA-----LSLPDPMYKSDSWLGRG-----
 MP08656 AVMDAPKSGRKLMDRV-----LSRDRSLFPYEKVL-----
 MP00604 RTLDGAKTGLMVKEDV-----FAADKKSYN-RGVM-----
 MP02213 TMMDGGKTGLTLRPSA-----FEKLSSTHTANEAT-----
 PB_RdRP-2 SAVDFPKSGIPAILPD---DLKVRCPDFM-----QKKDKESYPSKKVLGKIFRAIDN
 MP11137 LAVDYPKSGNPVPIQD--IPKRSNEKLPDWYAPETMYTLTDSKYYPQSQAIGKLFRAIAL
 MP09882 LAVDYPKTGMPVPHKS--IPKLFKAKPDYQAPETANISSNTNYYPQSQAIGRFRIRINL
 MP02297 QAVDYPKNGIPVDLDKDRPLNTRLIRCKPDWHAAEVV-DPRGTDYIMSTRALGEMFRKVRRL
 MP10417 QAVDYSKHGVAIDLESNPLPRKLMRCPDWQASTDP-SPRETDYESTRALGRMYQKCLK
 MP15899 QAVDGASVKIPERLTS--PPEPPGDFILDLLAKA---ATAFAEEFIQTSMIASGGGGVDR

* :

NC_RdRP_QDE-1 -----E-PTHIIDYLKFSIARPAI
 MP08656 -----PWKKTIDRLSGTSKDTSTGTIELRR-----AGDQRSFIMDVLVQEA
 MP00604 -----KWKKPAIKSSMKSQYVSDDGGMKVER-----PEHLGPFIMDSLKVYS-
 MP02213 -----LAN-----PTRACTVLE-----
 PB_RdRP-2 SDYKEY-----KTKLISTTKYDVRLRVK
 MP11137 DAPQNV-VRSGRKQRRRAR--REAVEEELDELADDFVDLAVEMHDPLSTAVEARVTEFID
 MP09882 PPLQTN-VPLGRDQRRRIRDGQDGGSGSVNNLARSLANIRIP-DNPLVEALEEHVQY--
 MP02297 AEPTDI-ASTLSNPSNSST-----WTAISGILSDIIVSCFG
 MP10417 DLPH---YRPPENNAHSQ-----PDALSSILKDKIRPYLD
 MP15899 EDHERILLRLLQNQNQHNTISEY-----QLFTL-----AWRFCHKFSLPLVSYMG

NC_RdRP_QDE-1 DKELEAFHNA-----MKAAKDTEDEGAHF-----WDPDLASYTFFKEISDKSRS
 MP08656 --GLQDFWMA-----RAESIFDKSSDPICKTFILGADKDLLAPWFEFYQARA-----
 MP00604 -----LH-----RAATFERQFKERMLKHKHHIIDEHLVGPWRKAEKHAQQRKE
 MP02213 --ELQDFGMKRQRECMQHYQKQVAKDPQGP-----DPALLPLQELEGRLQLTK
 PB_RdRP-2 --GMERYVL-----EARTLKAN-----YDRDLSLMNQYGIQT-----
 MP11137 -----IDDSLDEE-----AKDHIRDLFQNYRSSLSESICS
 MP09882 -----
 MP02297 -----MIPQDQVQ-----SDQIAQIFHRYRDELRYICA
 MP10417 -----PGSCIDRN-----SDTILGIFRKYRGELRYICN
 MP15899 HFDLGAFTAQQKYAILST-MGLGLDKERHPQFWNSL---FRSDLLNERDLYQRCLDRPFS

NC_RdRP_QDE-1 SALLFTTLKNRIG-----
 MP08656 -----
 MP00604 K-----
 MP02213 KS-----P-----
 PB_RdRP-2 -----
 MP11137 ANTLAS-----
 MP09882 -----
 MP02297 THLSNT-----P-----
 MP10417 THILSET-----P-----
 MP15899 IQRLYSSRVNGLATFFEYLRMAMQEYTRKVLVLKTDDRFAVGIFMRGEIPWDEDPIVKDN

NC_RdRP_QDE-1 -----EVEKEYGRLVKNKEM-----
 MP08656 -----VGRPHTLNDLQIKNHVES-----

MP00604 -----GCPLDMQVLDEIRNHVKK-----
 MP02213 -----ATAEFKREELNQIRQHVQS-----
 PB_RdRP-2 -----EAEITSGYIIKWLKK-----
 MP11137 -----GPTAMLTEEEAIIGTIVA-----
 MP09882 -----
 MP02297 -----G-VTLLEAEVVMGTILA-----
 MP10417 -----GHPSALQESEVVMGTILT-----
 MP15899 VVVC SFLPQTTSTLSTYRPCTADYRLHCSDVNLQLYDKLRGNTFIFLTIPPRASGAEVVA

NC_RdRP_QDE-1 RDSKDPYPVRVNQV-YEKWCAITPEAMDKSGANYD-----
 MP08656 --VLDEFREKYDRT-----FTGKDIVK-----
 MP00604 --MYEKHREQVKKM-----RPKGNNGGHFTDLPIEV-----
 MP02213 --LHGLYKQAVQQAIHNK----PESPRKKAKQDRQHRKD-----
 PB_RdRP-2 SNRKSTHEIQQQAM-----TAATNLK-----
 MP11137 --NTSQPRKRLDHI-----RKLREQT-----
 MP09882 -----
 MP02297 --KCSQKRWRKDRI-----FRMRNHA-----
 MP10417 --RYTDKNWRKDRT-----WRMKHHT-----
 MP15899 SIALQKFSARVQRQ-----LGRNLNRQPVTGIEIHVVSNRDRVSHQLFDLW

NC_RdRP_QDE-1 ----SKVIRLLELSF-----
 MP08656 ----RQDTLRRLSKAF-----ISFPKP
 MP00604 ----RQNQLRDLKSKAF-----ASYPNP
 MP02213 ----KKQKQDIAHEF-----SQP
 PB_RdRP-2 ----NAWRKEFEKEF-----LSGSTT
 MP11137 ----DTLVRAVRESL-----AGDDDI
 MP09882 -----
 MP02297 ----GTLVNEVKKKF-----ATGKDK
 MP10417 ----GMLVRDVKVSLKA-----LNAEGVDP
 MP15899 FEHVPTEQRVRRFEREVAPYSLNEIKDVKWDEHPPWMQTMFYQDQDQVVTRL-LQGKTP

NC_RdRP_QDE-1 ----LADREMNTWALLRAST-----AFKLYY
 MP08656 DDLESVMDE--ETIARLRAS-----YAYH
 MP00604 DDL--MLDE--DTISRLRAS-----YAYL
 MP02213 LDNILLFSR--KTVMELKAS-----YAYF
 PB_RdRP-2 R---IIDNETEAVMEMKAAA-----W-----YYVTY
 MP11137 SP-----GESLHRAFYA-----W-----QIAKH
 MP09882 -----
 MP02297 SEE-----EMKEALKISWLA-----W-----EYALN
 MP10417 -----RETLELVWCA-----W-----DFSSR
 MP15899 DEM-----DKCMELALAYHAEDELFRILYVILAQEPDIRDQVIKWMMDLHPPLAFMLL

NC_RdRP_QDE-1 HKSP-----KFV
 MP08656 F-----LKSNTGK-----QFS
 MP00604 HDCEANKYTDKGWT-----RFP
 MP02213 LN-----P-----RFA
 PB_RdRP-2 HPTEQHRLTTVEGN-----FLSFP
 MP11137 FCHIRNRSTSFGAR-----SFW
 MP09882 -----
 MP02297 RAVDPDEGKRFGAN-----SFA
 MP10417 RASE-----FGAN-----SFG
 MP15899 KKYPPEAGSLPAESQPFRRNILHNIIRSSNLGIACLVAFKMTGTITQLSVEDYFSL

NC_RdRP_QDE-1 WQMAGR--QLAYIKAQMTS-----RPGEGAPALMTAFMYAGLM----
 MP08656 WLMAFD--ELCLIKAK-----KSKSGFRAIMDFADVLKV----
 MP00604 WDVAMS--ELCLIKGK-----AIGGSKTVAAGYYDRFFL----
 MP02213 FEVAFQ--TLTCLKSD-----SMPGGTVA-----
 PB_RdRP-2 WVAE---KYLCKLAKRNGSREETEELAKALDDEVIQEAERMKSRGLVIEMLD-----
 MP11137 WVSLGA--VFESIKEI-----
 MP09882 -----
 MP02297 LVALDC--VLHAVEDL-----ERSGALTKEVDKAKNELNGKGAAVNGYPD---MS---
 MP10417 IVALGC--LLHSLEKL-----S---

MP15899 WLSALSIRSRLQLVQET-----LLVLNDCRASQTPSPALQYGHRHALGIAMDR

NC_RdRP_QDE-1 -----PDKKFTK-----QYV-----ARLE---
 MP08656 -----PRTVIP-----EDGVYARTVPFN
 MP00604 -----
 MP02213 -----STRED-----DQSKTT-----
 PB_RdRP-2 --SESDY----DDDEEEKERKYR--VKSKMK-----ESGHPSRDE---
 MP11137 -----EQEEIN-----ERRREAR-----
 MP09882 -----
 MP02297 --DEMDIKGARRAANEGAKPKGKS--RKSKAN-----NTFTIGRIH---
 MP10417 --QLADV-----
 MP15899 AEEAADEC----PCDEDGKPRKQRTPPSQTRLKRVEDESQVVATLRVDSRTPIRLHSHV

NC_RdRP_QDE-1 -----
 MP08656 FLQ-----TTTLT
 MP00604 -----
 MP02213 -----
 PB_RdRP-2 -----
 MP11137 -----
 MP09882 -----
 MP02297 -----
 MP10417 -----
 MP15899 RLQAASKPDNRWVPSIVLDGIVVQSMKGELKVELLHPPPEMEVMDWNMYHAGSTATSRA

NC_RdRP_QDE-1 -----
 MP08656 MVEE-----GIYQ--IKNIETST-----
 MP00604 -----
 MP02213 -----
 PB_RdRP-2 -LEE-----EKEEEEE-----
 MP11137 -----
 MP09882 -----
 MP02297 -AET-----RGNEKAKS-----
 MP10417 -----
 MP15899 MLDALARLLKDKSECCGFYSIITGHEEEEEPAAPGEMFHLLGQEEHLSNLNGSQEMAVR

NC_RdRP_QDE-1 -----GDGSEYPDPEVYE-----
 MP08656 -----IVHTIKEGENVIVAGAPIRYADPGIAGLWVSA
 MP00604 -----
 MP02213 -----
 PB_RdRP-2 -----EEESDDDLTELHLTNA
 MP11137 -----
 MP09882 -----
 MP02297 -----
 MP10417 -----
 MP15899 SCSVPLSLIWGPPGTGKTTVIVQILCALVKTKNEDSRILMTASTHNAVDNVLERFIAINK

NC_RdRP_QDE-1 -----
 MP08656 PQDSPKSD--LRVFKNI-----KLNSVVS--G
 MP00604 -----
 MP02213 -----
 PB_RdRP-2 TPKPKLEE-----
 MP11137 -----
 MP09882 -----
 MP02297 -----
 MP10417 -----
 MP15899 TQKVLREEQILRVATDLSKVNKDLQSFTIDARVGGDMNENKLFKKAQERLNAAVIVFTT

NC_RdRP_QDE-1 -----VLGDD-DFD-----GIG-----
 MP08656 VEDSGVQTMGKPVFVIEPADSE-----VPG-GRAFII-KH-----
 MP00604 -----
 MP02213 -----

PB_RdRP-2 -ASSLSIIYKD-PFD---TDSS-----KG-----
 MP11137 -----
 MP09882 -----
 MP02297 -----
 MP10417 -----
 MP15899 CAGAGLGILRKA-EFDIALIDEASQINEPCALIPLVKGVQRILVGDHVQLRPTVKKIGK

NC_RdRP_QDE-1 -----
 MP08656 -----PDN-----ERVWTIPSQPFIRGDVH-----
 MP00604 -----
 MP02213 -----
 PB_RdRP-2 -----
 MP11137 -----
 MP09882 -----
 MP02297 -----
 MP10417 -----
 MP15899 VLGFDVSLLERLYIGPDQVGLSKAMLDIQYRFPQELAAFPSREFYEGRLHSGIQDSNAVL

NC_RdRP_QDE-1 -----FTGNGDY-----
 MP08656 --LRP-----RSGEDRQ-----
 MP00604 -----SKTRQ-----
 MP02213 -----SGAANK-----
 PB_RdRP-2 -----INGKNQT-----
 MP11137 -----RRNRA-----
 MP09882 -----
 MP02297 -----NGKSRR-----
 MP10417 -----
 MP15899 GVLRQTTFWPVDDNQVIVPTIFIQCSAEEDMGGRSKSNTGQVDLIVDRIIPLLTTPNEA

NC_RdRP_QDE-1 -----
 MP08656 -----KWLF--IKQEQA---
 MP00604 -----
 MP02213 -----V-----SKLHAQAQV--
 PB_RdRP-2 -----RFDADAS---
 MP11137 -----
 MP09882 -----
 MP02297 -----
 MP10417 -----
 MP15899 TNPADLKITVLSYKQITELRSRLPSMATASTIDAFQGRESIIIFSSVRCNAEADIGF

NC_RdRP_QDE-1 -----
 MP08656 -----QCRSVF-----RTMSDTA--DRKGGTVLDCIDVHSVS---
 MP00604 -----
 MP02213 L-----
 PB_RdRP-2 -DDA-----LSRALL-----G
 MP11137 -----
 MP09882 -----
 MP02297 -----
 MP10417 -----
 MP15899 VDDARRLNVMWTRARLAMIIIVGDRRTLEVNTMWKRAVGACKEVMLDETALASGG