



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Caracterização do carlavírus *Melon yellowing-associated virus* e do  
polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* em meloeiro**

**THIAGO MARQUES COSTA**

**BRASÍLIA – DF**  
**2018**

**THIAGO MARQUES COSTA**

**Caracterização do carlavírus *Melon yellowing-associated virus* e do polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* em meloeiro**

Dissertação apresentada à  
Universidade de Brasília  
como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre  
em Fitopatologia pelo  
Programa de Pós Graduação  
em Fitopatologia

**Orientadora:**

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

**BRASÍLIA**  
**DISTRITO FEDERAL - BRASIL**  
**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Thiago Marques.

Caracterização do carlavírus *Melon yellowing-associated virus* e do polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* em meloeiro./Thiago Marques Costa

Brasília, 2018.

p. 120.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,  
Universidade de Brasília, Brasília.

1. Melon yellowing-associated virus e Cucurbit aphid-borne yellows virus – Caracterização

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Caracterização do carlavírus *Melon yellowing-associated virus* e do polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* em meloeiro.

*A toda minha família (Marques e Costa)  
e àqueles que, de certa forma, mesmo indiretamente, contribuíram,  
dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus orientadores, Alice e Tatsuya.

À Alice por todo o esforço dedicado ao longo desse tempo para me permitir espaços e ambientes importantes de crescimento e aprendizagem. Sobretudo, agradeço pelo apoio e incentivo. O mais importante resultado de todo esse tempo é a nossa amizade.

E ao Tatsuya por ter me oferecido o projeto, o laboratório e o tempo de ensinamentos que serão úteis não só à vida acadêmica. A paciência e conselhos foram muito importantes.

A toda família Marques e Costa, pelo apoio e incentivo, em especial a minha avó Selma e ao meu Pai Edson.

Aos parceiros de pós-graduação 2016-1: Érica, Déborah, Aline e Sofia. E aos que surgiram, como a Jamile e Lincon. Aos amigos da vida: grupo “Desbraves” e da graduação (Deh, Lah, Deza, Pedro e Matheus), que me acompanham e participam.

À Cíntia pelo acolhimento, ombro, paciência, palavras e carinho por todo esse tempo.

Aos colegas de laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças Camila, Erich, Tadeu, Thais, Natália, Cristiano, Moana, pelo apoio, disponibilidade e provocações de sorrisos.

Da mesma forma agradeço aos colegas do Laboratório da UnB Liz, Raquel<sup>2</sup>, João, Nataly, Layssa, Léo, Matheus, Ravi e especialmente à Rosana, que contribuiu diretamente na realização deste trabalho.

Ao povo brasileiro que financiou o meu estudo de pesquisa.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelo seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram todo meu aprendizado acadêmico e ético, durante a realização da pós-graduação.

À Embrapa Hortaliças pela concessão do espaço para realização de grande parte dos

experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Professora Alice Kazuko Inoue Nagata**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Embrapa Hortaliças e Universidade de Brasília (UnB).

**CARACTERIZAÇÃO DO CARLAVÍRUS *Melon yellowing-associated virus* E DO POLEROVÍRUS *Cucurbit aphid-borne yellows virus* EM MELOEIRO.**

**THIAGO MARQUES COSTA**

DISSERTAÇÃO APROVADA em 16/02/2018 por:

---

Dr. Alexandre Furtado Silveira Mello  
Embrapa Hortaliças – CNPH (Examinador Externo)

---

Dr. Renato de Oliveira Resende  
Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (Examinador Interno)

---

Dr. Alice Kazuko Inoue Nagata  
Embrapa Hortaliças – CNPH (Orientador - Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2018

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO GERAL</b> .....	iv
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	vi
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	2
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	2
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
1.1. A cultura do meloeiro no Brasil.....	5
1.2. Principais viroses do meloeiro.....	9
1.3. Família <i>Luteoviridae</i> .....	16
1.3.1. Características taxonômicas e gerais da família <i>Luteoviridae</i> .....	16
1.3.2. Gênero <i>Polerovirus</i> .....	21
1.4. Família <i>Betaflexiviridae</i> .....	24
1.4.1. Características taxonômicas gerais da família <i>Betaflexiviridae</i> .....	24
1.4.2. Gênero <i>Carlavirus</i> .....	26
1.5. Sequenciamento de nova geração (NGS) e exemplos de seu uso na identificação de vírus associados a doenças em plantas.....	29
<b>CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM NOVO RECOMBINANTE INTERESPECÍFICO DE <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> EM MELOEIRO NO BRASIL</b> .....	33
<b>RESUMO EXPANDIDO</b> .....	33
<b>ABSTRACT</b> .....	34
2.1. INTRODUÇÃO .....	35
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.2.1. Obtenção das amostras de meloeiro.....	36
2.2.2. Semi-purificação de partículas virais e preparação do RNA para NGS.....	37
2.2.3. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática.....	38
2.2.4. RT-PCR para validação dos dados de NGS.....	38
2.2.4.1. Determinação da sequência do genoma completo de dois isolados (M3 E JMB1) de <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV).....	38
2.2.4.2. Determinação da sequência da extremidade 5' do genoma do isolado M3 e JMB1 de CABYV por 5'RACE.....	41
2.2.4.3. Determinação da sequência da extremidade 3' do genoma do isolado M3 e JMB1 de CABYV por 3'RACE.....	43
2.2.4.4. Análise filogenética e de recombinação das sequências genômicas dos isolados M3 e JMB1 de CABYV.....	44
2.3. RESULTADOS .....	46
2.3.1. Obtenção da sequência do genoma completo do isolado de CABYV via plataforma Illumina.....	46

2.3.2	Validação do genoma completo dos isolados M3 e JMB1 de CABYV via Sequenciamento automático convencional (Sanger).....	49
2.3.3.	Organização genômica dos isolados M3 e JMB1 de CABYV.....	50
2.3.4.	Análise de recombinação dos isolados M3 e JMB1 de CABYV.....	52
2.3.5.	Análise filogenética do isolado M3 e JMB1 de CABYV.....	57
2.3.6.	Análise de relógio molecular do CABYV brasileiro.....	59
2.4.	DISCUSSÃO.....	60
2.5.	FIGURAS COMPLEMENTARES.....	63
<b>CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E TRANSMISSÃO POR MOSCAS-BRANCAS (<i>Bemisia tabaci</i>) DO ISOLADO BRASILEIRO DE <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV).....</b>		<b>66</b>
RESUMO .....		66
ABSTRACT .....		67
3.1. INTRODUÇÃO .....		68
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....		69
3.2.1.	Estabelecimento de um isolado do <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV).....	69
3.2.2.	Detecção do CABYV por RT-PCR.....	69
3.2.3.	Criação de moscas-brancas ( <i>Bemisia tabaci</i> biótipo b).....	70
3.2.4.	Ensaio-piloto de transmissão por mosca-branca ( <i>Bemisia tabaci</i> ) do isolado brasileiro de CABYV.....	70
3.2.5.	Purificação de partícula viral.....	72
3.2.6.	Análise da eficiência do antissoro.....	75
3.2.6.1.	Teste por Dot-ELISA para avaliar a eficiência do antissoro bruto e da IgG purificada	75
3.2.6.2.	Teste da eficiência da IgG-conjugada por DAS-ELISA.....	76
3.2.7.	Transmissão do isolado brasileiro de CABYV por mosca branca ( <i>Bemisia tabaci</i> ).....	77
3.2.7.1.	Detecção do CABYV em mosca branca utilizadas nos ensaios.....	77
3.2.7.2.	Ensaio de transmissão do CABYV por mosca-branca em condições controladas.....	78
3.2.7.3.	Detecção por DAS-ELISA do CABYV nas amostras do ensaio de transmissão com mosca-branca.....	80
3.3. RESULTADOS .....		80
3.3.1.	Origem do isolado.....	80
3.3.2.	Antissoro policlonal produzido.....	81
3.3.3.	Ensaio-piloto de transmissão do isolado brasileiro de <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV) por mosca branca ( <i>Bemisia tabaci</i> ).....	84
3.3.4.	Ensaio de transmissão do isolado brasileiro de CABYV por mosca branca ( <i>B. tabaci</i> ) em condições controladas.....	86
3.4. DISCUSSÃO .....		91
<b>CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO <i>Melon yellowing-associated virus</i> ISOLADO DE PLANTAS DE MELÃO COM SINTOMAS DE “AMARELÃO DO MELOEIRO” NO NORDESTE DO BRASIL.....</b>		<b>97</b>
RESUMO EXPANDIDO.....		97
4.1. MANUSCRITO PUBLICADO .....		i98
4.2. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		108

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS DA DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>108</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>112</b>

## RESUMO GERAL

COSTA, Thiago Marques. **Caracterização do carlavírus *Melon yellowing-associated virus* e do polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* em meloeiro**. 2018. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

A região Nordeste é a maior produtora de melão no Brasil, contribuindo com cerca de 90% da produção nacional. Os Estados do Rio Grande do Norte e Ceará juntos produzem desde 2010 cerca de 500 mil toneladas/ano em 21.000 ha de área plantada, sendo os maiores estados produtores do país. O Brasil ocupa o 11º lugar no ranking mundial de produção de melão, sendo este fruto um dos mais exportados nos últimos anos no país. No Brasil, as viroses destacam-se entre os principais problemas fitossanitários que afetam as cucurbitáceas, causando redução na qualidade dos frutos e perda significativa na produção. Os principais vírus que infectam o meloeiro são os potyvírus, comovírus, cucumovírus, tospovírus e carlavírus. O “Amarelão do meloeiro” é considerado a principal doença dessa cultura. Essa doença é caracterizada por apresentar forte clorose nas folhas mais velhas e é associada, até então, ao carlavírus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) como o agente causador. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os vírus potenciais candidatos a agente causador do “Amarelão do meloeiro”. Um conjunto de amostras de meloeiro apresentando sintoma de “Amarelão do meloeiro” foi coletado em Mossoró (RN) e Juazeiro (BA) e os ácidos nucleicos purificados foram sequenciados utilizando a tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) pela plataforma Illumina HiSeq 2000. Foram identificadas em alta frequência sequências com alta identidade ao genoma do carlavírus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) e ao polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV). Foi elaborada a hipótese de que um desses dois vírus, ou ambos, seja o vírus causador da doença e, portanto, foram caracterizados neste estudo. O isolado de MYaV caracterizado molecularmente foi proveniente de Mossoró sendo denominado isolado M22-MYaV e os isolados de CABYV denominados CABYV-M3 e CABYV-JMB1, de Ceará (CE, perto da cidade de Mossoró) e Juazeiro (BA), respectivamente. A determinação do genoma completo foi realizada a partir de NGS e por sequenciamento pelo método Sanger. O genoma do MYaV possui 9073 bases e codifica seis proteínas: RdRp (ca. 6,2 kb), TGB1 (ca. 0,7 kb), TGB2 (ca. 0,3 kb), TGB3 (ca. 0,2 kb), CP (ca. 1 kb) e NaBp (ca. 0,4 kb). A análise filogenética utilizando a sequência da proteína de replicação (RdRp) do MYaV mostrou que o vírus apresenta maior relacionamento com o carlavírus Sweet potato yellow mottle virus (59,8%), confirmando a classificação do MYaV dentro do gênero *Carlavirus*. O genoma dos isolados M3 e JMB1 de CABYV é de cerca de 5,7 kbases, codificando sete ORFs: ORF0 (0,7 kb), ORF1 (ca. 1,8 kb), ORF2 (ca. 1,3 kb), ORF3 (ca. 0,6 kb), ORF3a (ca. 0,1 kb), ORF4 (ca. 0,7 kb) e ORF5 (ca. 0,1 kb). O genoma dos dois isolados de CABYV apresenta 96,8% de identidade em nucleotídeo entre si e 73,7% com a sequência do isolado CABYV-N da França (X76931). A baixa identidade de sequência entre os isolados brasileiros e o francês se deve a uma região de recombinação na extremidade 3' do genoma compreendendo as regiões que codificam a capa proteica (CP: ORF3 e ORF5) e proteína de movimento (MP: ORF4). O *major parent* do recombinante foi identificado como CABYV na análise, mas o *minor parent* não foi identificado dentro do conjunto de sequências de vírus utilizado. A análise filogenética e do relógio molecular sugere que os isolados M3 e JMB1 são possivelmente originários da França, tendo passado anteriormente pela Espanha e Taiwan. Um ensaio em condições controladas demonstrou que o isolado brasileiro de CABYV é eficientemente transmitido por moscas-brancas (*Bemisia*

*tabaci* biótipo B), apesar de ser classificado como um polerovírus que é tipicamente transmitido por afídeos. Foi possível produzir antissoro específico ao isolado brasileiro de CABYV, que se mostrou útil para testes de detecção por DAS-ELISA. Este estudo apresenta o genoma completo do MYaV e a caracterização molecular e filogenética de novos isolados de CABYV em meloeiro no Brasil e mostra evidências que um membro da família *Luteoviridae* pode ser transmitido por *Bemisia tabaci*.

**Palavras-chave:** “Amarelão do meloeiro”, *Carlavirus*, *Cucumis melo*, Moscas-brancas, *Polerovirus*.

## GENERAL ABSTRACT

COSTA, Thiago Marques. **Characterization of the carlavirus *Melon yellowing-associated virus* and of the polerovirus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in melon.** 2018. 120. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The Northeast region is the largest melon producer in Brazil, accounting for around 90% of the national production. Since 2010, together, the states of Rio Grande do Norte and Ceará have produced around 500,000 tons / year in 21,000 hectares of planted area, being the largest producing state in the country. Brazil occupies the 11th place in the world ranking of melon production, being one of the most exported fruit in recent years. In Brazil, viruses are among the main phytosanitary problems affecting cucurbits, causing a reduction in fruit quality and a significant loss of production. The major viruses that infect melon plants are potyviruses, cucumoviruses, tospoviruses and carlaviruses. "Amarelão do meloeiro", meaning melon severe yellowing, is considered as the main disease of this crop. This disease is characterized by the occurrence of strong chlorosis in the older leaves of infected plants and is associated with *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) as the causative agent. The objective of this work was to characterize potential virus candidates for the causative agent of "Amarelão do meloeiro". A set of melon samples showing "Amarelão do meloeiro" symptom was collected in Mossoró (state of Rio Grande do Norte) and Juazeiro (Bahia) and purified nucleic acids were sequenced using the Next Generation Sequencing (NGS) technology by the Illumina HiSeq 2000 platform. Sequences of the genome of the carlavirus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) and the polerovirus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) were found in high frequency. It was hypothesized that one of these two viruses, or both, is the virus that causes the disease and, therefore, were characterized in this study. Molecular characterized MYaV isolate was derived from Mossoró being named M22-MYaV isolate and the CABYV isolates were named CABYV-M3 and CABYV-JMB1, collected in Ceará (near the city of Mossoró) and Juazeiro (Bahia), respectively. Determination of the complete genome sequence was performed by NGS and by sequencing by the Sanger method. MYaV genome has 9073 bases and encodes six proteins: RdRp (ca. 6.2 kb), TGB1 (ca. 0.7 kb), TGB2 (ca. 0.3 kb), TGB3 (ca. 0.2 kb), CP (ca. 1 kb) and NaBp (ca. 0.4 kb). Phylogenetic analysis using the MYaV replication protein sequence (RdRp) showed that the virus was closely related to the carlavirus Sweet potato yellow mottle virus (59.8%), confirming the classification of MYaV within the genus *Carlavirus*. The genome of the CABYV M3 and JMB1 isolates is ~ 5.7 kbases, encoding seven ORFs: ORF0 (0.7 kb), ORF1 (ca. 1.8 kb), ORF2 (ca. 0.6 kb), ORF3 (ca. 0.6 kb), ORF3a (ca. 0.1 kb), ORF4 (ca. 0.7 kb) and ORF5 (ca. 0.1 kb). The genome of the two CABYV isolates shares 96.8% nucleotide identity to each other and 73.7% to the CABYV-N isolate from France (X76931). The low sequence identity between the Brazilian and French isolates is due to a region of recombination at the 3' end of the genome comprising the regions encoding the coat protein (CP: ORF3 and ORF5) and movement protein (MP: ORF4). The major parent of the recombinant was identified as CABYV in the analysis, but the minor parent was not identified within the set of virus sequences used. Phylogenetic and molecular clock analyses suggest that the M3 and JMB1 isolates are possibly from France, having previously passed through Spain and Taiwan. A transmission test performed under controlled conditions has demonstrated that CABYV Brazilian isolate is efficiently transmitted by whiteflies (*Bemisia tabaci* biotype B), although it is classified as a polerovirus, that is typically transmitted by aphids. It was possible to produce a specific antiserum to the

Brazilian CABYV isolate, which proved useful for DAS-ELISA detection tests. This study presents the complete genome of MYaV and the molecular and phylogenetic characterization of new isolates of CABYV in melon in Brazil and shows evidence that a member of the family *Luteoviridae* can be transmitted by *Bemisia tabaci*.

**Keywords:** “Amarelão do meloeiro”, *Carlavirus*, *Cucumis melo*, *Polerovirus*, whiteflies.

## INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, o Brasil é o 11º maior produtor no ranking mundial de produção de melão (FAO, 2014). A produção de melão nos últimos três anos tem variado entre 566 a 590 mil toneladas/ano (IBGE, 2016), sendo os estados do Rio Grande do Norte e do Ceará os principais produtores, onde grande parte da sua produção é exportada para países da Europa, EUA e Canadá (Araújo e Vilela, 2003).

No Nordeste brasileiro, as viroses de maior importância em cucurbitáceas são: da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*: *Papaya ringspot virus*, estirpe Watermelon (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV); da família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*: *Cucumber mosaic virus* (CMV); da família *Secoviridae*, gênero *Comovirus*: *Squash mosaic virus* (SqMV) (Lima e Vieira, 1992; Lima *et al.*, 2012; 2012; Oliveira *et al.*, 2000; Rabelo Filho *et al.*, 2005; Zambolin *et al.*, 2000) e o vírus do “Amarelão do meloeiro”, *Melon yellowing-associated virus* (Oliveira *et al.*, 2000), da família *Flexiviridae*, gênero *Carlavirus* (Nagata *et al.*, 2003; Nagata, 2005).

Inicialmente, a doença do “Amarelão do meloeiro” foi associada à deficiência nutricional devido à dificuldade na determinação de algum agente patológico (Faria & Pereira, 1982; Lima *et al.*, 2008). Então, em 2003, a partir de extensivas análises para detecção de algum vírus fitopatogênico, o carlavírus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) foi associado como candidato ao agente causal. As análises envolveram microscopia eletrônica em folhas de meloeiro apresentando sintomas de forte clorose, com coloração amarela intensa nas folhas (Nagata *et al.*, 2003) e caracterização parcial do genoma (Nagata *et al.*, 2005; 2010). Essa doença provoca a redução da área fotossintética da folha o que implica no baixo acúmulo de açúcar nos frutos resultando em prejuízos na comercialização (Nagata *et al.*, 2005). Foi demonstrado por Nagata *et al.* (2005) que o MYaV é transmitido por moscas-

brancas, não sendo transmitido mecanicamente. O MYaV ocorre nos principais polos de produção de melão no Nordeste, principalmente no Rio Grande do Norte (Lima *et al.*, 2009). Para controlar a doença é empregado um rigoroso programa de manejo integrado, como a eliminação de restos culturais e de plantios abandonados, tendo em vista a eliminação/redução do inseto vetor (Lima *et al.*, 2009; Ávila & Reis, 2007). Utiliza-se também, na região de Mossoró e arredores, a cobertura das plantas na fase inicial com tecido-não-tecido para a redução das taxas de infecção precoce das plantas. Há ainda dúvidas se o agente causal do “Amarelão do meloeiro” é realmente e somente o MYaV, sendo, portanto, necessárias pesquisas para elucidar essa questão (Lima *et al.*, 2012). Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os vírus potenciais candidatos a agente causador do “Amarelão do meloeiro”. Para isso, foi utilizada a ferramenta de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) que revelou o potencial envolvimento de dois vírus, o carlavírus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) e o polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV).

## **OBJETIVO GERAL**

Este estudo tem como objetivo caracterizar os dois vírus potenciais candidatos a agente causador do “Amarelão do meloeiro”, o carlavírus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) e o polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) da região Nordeste do Brasil.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Coletar amostras de plantas de meloeiro com sintomas de amarelão e realizar análise por NGS de ácidos nucleicos extraídos dessas plantas para identificação dos vírus associados à doença;
- Selecionar e manter um isolado de MYaV e de CABYV em plantas em casa-de-vegetação;

- Determinar a sequência do genoma completo do MYaV e de CABYV por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e sequenciamento automático tradicional;
- Produzir antissoro policlonal de CABYV para utilizar em testes de detecção;
- Determinar o inseto vetor de CABYV.

# CAPÍTULO 1

---

---

## REVISÃO DE LITERATURA

## CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

A revisão bibliográfica está dividida em cinco seções. Inicialmente, aborda-se sobre os aspectos gerais da cultura do meloeiro, em que são citados dados de produção e da importância econômica do melão no país. Em seguida, abordam-se as características taxonômicas e gerais da família *Luteoviridae* e *Betaflexiviridae*. Os gêneros que pertencem a essas famílias, *Polyomavirus* e *Carlavirus*, respectivamente, são enfocados nesta revisão, pois constituem os grupos virais estudados e reportados nesta dissertação.

Nesta pesquisa foi feito estudo da transmissão por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) de um novo polerovírus. A mosca-branca é considerada uma das principais pragas da agricultura mundial atualmente. A espécie mais difundida em muitas regiões do mundo é a *B. tabaci Middle East Asia Minor 1* (MEAM1 ou antigo biótipo B) e *B. tabaci Mediterranean* (MED ou antigo biótipo Q) (van Brunschot *et al.*, 2014). No Brasil, MEAM1 foi introduzido em 1990 e, desde então, tem se mostrado como importante praga em espécies hortícolas, sendo responsável tanto pelos danos diretos ocasionados por sua alimentação, como os indiretos pela transmissão de vírus. Este inseto ocorre em alta população no ambiente agrícola, sendo amplamente polífago e participante de problemas epidemiológicos no Brasil e no Mundo.

Por fim, foi brevemente revisada a aplicabilidade do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) na virologia vegetal, por ser a principal tecnologia empregada neste trabalho.

### 1.1. A cultura do meloeiro no Brasil

A família Cucurbitaceae é formada por 97 gêneros com 950 espécies de plantas (Robinson & Decker-Walters, 1999). No Brasil, as principais espécies cultivadas são aquelas pertencentes aos gêneros *Citrullus*. (melancia), *Cucumis* (pepino, maxixe e melão), *Cucurbita*. (moranga, abóbora e abobrinha), *Lagenaria* (cabaça-caxi) e *Sechium* (chuchu) (Pinto, 2003; Lima *et al.*, 2015). A partir dos anos 90, o Nordeste brasileiro tem se destacado no cultivo de

cucurbitáceas, como a melancia (*Citrullus lanatus*) e principalmente o meloeiro (*Cucumis melo*), transformando o Brasil em um grande exportador de melão (Lima *et al.*, 2015).

O meloeiro é uma planta de clima tropical originário da África, entretanto, foi na Índia que ocorreu a sua dispersão para outros países (Filgueira, 2008). Essa olerícola possui grande importância econômica no Brasil por ser uma das frutas mais exportadas. A China é a maior produtora do mundo, com mais de 45% da produção mundial, seguida pela Turquia (5,7%), Irã (4,9%) e Egito (3,5%). O Brasil, atualmente, ocupa a 11<sup>o</sup> posição no *ranking* mundial de produção de melão (**Tab. 1**) com mais de 589 mil toneladas segundo o último levantamento em nível mundial de 2014 da FAO (FAOTAST, 2014), destacando-se como o principal produtor da América do Sul. O último censo em nível nacional pelo IBGE (2016) de produção de melão demonstrou uma ampliação para mais de 595 toneladas do fruto. A região Nordeste é a maior produtora do país correspondendo a mais de 95% da produção nacional, produzindo mais de 570 mil toneladas (**Tab. 2**; IBGE, 2016). Os principais estados produtores são o Rio Grande do Norte e o Ceará, responsáveis juntos por praticamente 78% da produção brasileira (**Fig. 1**; IBGE, 2016). Em seguida, destacam-se Bahia, Piauí, Pernambuco e Rio Grande do Sul (**Fig. 1**). Além da importância econômica para o país, o cultivo do meloeiro tem grande valor social por ser fonte de emprego nas principais áreas produtoras da região Nordeste (Lima *et al.*, 2008). A produtividade do meloeiro destaca-se pelo número de frutos que uma planta pode apresentar. Quando cultivadas de forma protegida, plantas dessa espécie produzem de um a três frutos, devido ao abortamento natural das flores (Chitarra & Chitarra, 2005). De modo geral, o meloeiro trata-se de uma planta anual, herbácea, com caule de crescimento rasteiro ou prostrado, folhas de tamanho e forma bastante variadas e flores que podem ser hermafroditas, femininas ou, na sua maioria, masculinas e hermafroditas (Fontes & Puiatti, 2005). Os frutos apresentam-se com formas que variam de esféricas a alongadas, peso variável, sabor da polpa de amargo a doce, contendo de 200 a 600 sementes na cavidade

central (Pedrosa, 1997; Stepansky *et al.*, 1999). A maioria das cultivares de meloeiro apresentam flores masculinas e hermafroditas, de coloração amarela, com cinco pétalas (Delaplane & Mayer, 2005).

O plantio do meloeiro é feito por dois métodos: 1) a semeadura direta no local definitivo; ou 2) o transplante de mudas produzidas em bandejas de isopor ou de plástico. O cultivo pode ser feito em área aberta em forma protegida, apesar da área de cultivo protegido ser pequena (Ancelotti & Costa, 2010).

**Tabela 1.** Ranking mundial de produção de melão (ton).

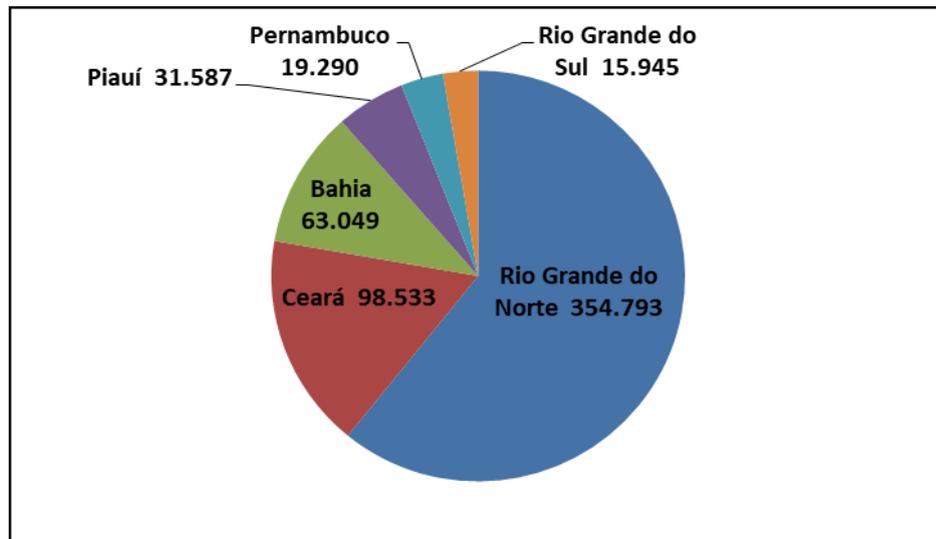
<b>Posição</b>	<b>País</b>	<b>Produção (ton)</b>
1	China	14.752.900
2	Turquia	1.707.302
3	Irã	1.476.801
4	Egito	1.049.849
5	Índia	1.034.008
6	Cazaquistão	914.682
7	Estados Unidos	787.030
8	Espanha	750.151
9	Marrocos	736.546
10	Guatemala	643.879
11	Brasil	589.939
12	Itália	560.344
13	México	526.990
14	Honduras	308.877
15	Bangladesh	293.000

**Fonte:** FAOSTAT/FAO (2014)

**Tabela 2.** Quantidade de melão produzido no Brasil por região (ton).

<b>País</b>	<b>Produção</b>
Brasil	596.430
Nordeste	570.838
Sul	20.242
Centro-Oeste	3.931
Norte	1.081
Sudeste	338

**Fonte:** IBGE - Produção Agrícola Municipal (2016)



**Figura 1.** Gráfico apontando os principais estados produtores de melão do Brasil (em toneladas).  
**Fonte:** IBGE - Produção Agrícola Municipal (2016).

O melão é o fruto mais exportado do país com mais de 196 mil toneladas exportadas. Os principais importadores do fruto provenientes da produção brasileira são a Holanda, Reino Unido e Espanha (Sebrae, 2016). O fruto tem gerado mais de 140 milhões de dólares em exportações, segundo o último levantamento feito na safra 2015/16 (Cepea, 2016). Os principais tipos de melão produzidos na região Nordeste são conhecidos como gália, cantaloupe, amarelo (melão espanhol), pele de sapo e *Orange flesh*. Cultiva-se também em grandes áreas a melancia (*Citrullus lanatus*) de cabeça pequena para exportação. Outras curcubitáceas também são importantes nessa região, como as abóboras (*Cucurbita* spp.), pepino (*Cucumis sativus*), maxixe (*C. anguria*), cabaça (*Lagenaria siceraria*) e a bucha (*Luffa cylindrica*), que são cultivadas em pequenas áreas para uso próprio do agricultor, subsistência e fabricação de artefatos (Queiroz *et al.*, 2001).

O meloeiro é alvo do ataque de diversos patógeno, como vírus, nematoide, fungo, bactéria, entre outros. Nesta revisão, serão focadas somente as viroses por ser tema de estudo

desta dissertação.

## 1.2. Principais viroses do meloeiro no país

As viroses se destacam como as principais doenças do meloeiro e das cucurbitáceas em geral. Elas podem ocorrer em altas incidências e em diferentes níveis de severidade, podendo resultar em reduções drásticas na produção total e na qualidade do fruto. As perdas variam de acordo com a idade da planta, da cultivar utilizada, do vírus e das condições ambientais. Esses vírus podem provocar diferentes tipos de sintomas que variam desde mosaicos foliares, nanismo, deformações nas folhas e nos frutos e morte da planta (Ávila & Reis, 2007; Lima, 2011). É destacada a ocorrência de infecção mista de vírus em cucurbitáceas, uma vez que uma pode servir de reservatório para a outra no campo (Lima, 2011), dificultando o controle dessas viroses.

As viroses de meloeiro que se destacam nos principais países produtores são provocadas por espécies do gênero *Potyvirus*, *Crinivirus*, *Cucumovirus* e *Polerovirus* (Luis-Arteaga *et al.*, 1998; Lecoq, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Ávila & Reis, 2007; Keshavarz *et al.*, 2014; Knierim *et al.*, 2010; Manglli *et al.*, 2016). Nos últimos anos, espécies de polerovírus, principalmente o *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV), têm sido relatados infectando meloeiro em diversos países da Europa, Ásia, Oriente e na América do Norte (EUA) (Yakoubi *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2008; Kassem *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015; Cheewachaiwit *et al.*, 2017). Isso pode estar relacionado com os frequentes eventos de recombinação que espécies de polerovírus sofrem na natureza e, com isso, adquirem capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros (Kinerim *et al.*, 2010; Kassem *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015; Ibaba *et al.*, 2017).

No Brasil são relatados cerca de dez vírus que infectam cucurbitáceas e estes vírus podem ocorrer em infecção simples ou mista. Dentre as viroses de meloeiro no país, sete se destacam: mosaico do pepino (i), mancha anelar do mamoeiro (ii), vírus do mosaico da

melancia (iii), mosaico amarelo da abobrinha (iv), mosaico da abóbora (v), clorose letal da abobrinha (vi) e o amarelão do meloeiro (vii). Estas viroses foram ou são as principais viroses do meloeiro e serão abordadas com mais detalhes abaixo.

**i. Mosaico do pepino.** O cucumovírus *Cucumber mosaic virus* (CMV) é pouco frequentemente encontrado no Brasil e foi relatado no país desde a década de 80 (Cupertino *et al.*, 1988; Ávila & Reis, 2007). O CMV é o agente causal da doença conhecida como “Mosaico do pepino”. Segundo Ávila e Reis (2007), no meloeiro, essa doença se manifesta com um severo raquitismo das plantas, mosaico foliar evidente, deformação e redução drástica do tamanho de folhas e dos internódios. No estágio inicial da planta, os sintomas sistêmicos constituem-se de um proeminente enrolamento das folhas para dentro, mosaico e redução do limbo foliar. As flores, quando severamente atacadas, podem sofrer anormalidades, como o esverdeamento das pétalas. Em estágio mais avançado da doença, os frutos podem ficar distorcidos e geralmente pequenos e descoloridos. Além dos sintomas severos, a infecção de CMV em meloeiro afeta o transporte de açúcar depreciando a qualidade do fruto (Shalitin & Wolf, 2000). O CMV pertence ao gênero *Cucumovirus* classificado dentro da família *Bromoviridae*. Possui genoma de RNA de fita simples senso positivo, de três segmentos (RNA1, RNA2 e RNA3) e encapsidados em partícula icosaédrica não envelopada (Palukaitis *et al.*, 1992). O CMV é transmitido por várias espécies de afídeos, destacando-se as espécies *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* de forma não persistente (Francki *et al.*, 1979). O CMV infecta outras cucurbitáceas, como a melancia e pepino (Barbosa *et al.*, 2016), que podem servir como fonte de inóculo para o meloeiro no campo, quando plantadas juntas. A medida de controle mais eficiente de CMV em meloeiro é o uso de variedade resistente (Guiu-Aragonés *et al.*, 2015). Controlar o vetor é uma medida pouco eficiente, uma vez que o CMV é transmitido de forma não persistente (Ávila & Reis, 2007).

**ii. Mancha anelar do mamoeiro, estirpe melancia.** O potyvírus *Papaya ringspot virus* estirpe W de melancia (PRSV-W) é o agente causal da doença conhecida como mancha anelar do mamoeiro, presente no país desde a década de 70 (Lima & Gomes, 1975). Essa virose é considerada como umas das mais importantes do meloeiro, pois a infecção em estágio vegetativo da planta impede o seu desenvolvimento (Ávila & Reis, 2007). PRSV-W provoca sintomas em meloeiro de mosaico ou mosqueado de diferentes severidades. As folhas infectadas apresentam mosaico severo, deformações foliares e enrugamento com aparência de bolhas. A infecção pode causar sintomas no fruto, como esverdeamento, redução do tamanho e comprometimento da qualidade do Grau Brix, inviabilizando a sua comercialização (Lima *et al.*, 2011). São conhecidas duas estirpes de PRSV, PRSV-W que foi relatada primeiramente em (Ávila & Reis, 2007) e a PRSV-P, do mamoeiro (Bateson *et al.*, 1994). O vírus possui ampla gama de hospedeira de cucurbitáceas, como a abóbora, abobrinha, pepino (Yuki *et al.*, 2000). O PRSV pertence ao gênero *Potyvirus* classificado dentro da família *Potyviridae*. Os vírus classificados nessa família possuem genoma de RNA fita simples senso positivo, encapsidado em partícula de simetria helicoidal, flexuosa, não envelopada (King *et al.*, 2012). São transmitidos mecanicamente e por diversas espécies de afídeos, de maneira não-persistente (Gonsalves, 1994) e ainda não foi observada transmissão por semente. O controle dessa virose ocorre principalmente por meio de cultivares resistentes. Para o plantio, deve-se adotar áreas livres de plantas suscetíveis para controle da fonte de inóculo de PRSV-w (Ávila & Reis, 2007).

**iii. Vírus do mosaico da melancia.** O agente causal desta virose no meloeiro é o potyvírus *Watermelon mosaic virus* (WMV), antes denominado *Watermelon mosaic virus* estirpe 2 (WMV-2), para ser diferenciado da estirpe 1 (WMV-1) (Kurosawa *et al.*, 2005). Em comparação com PRSV-W, o WMV é menos importante para o meloeiro devido a sua baixa incidência nessa cultura (Yuki *et al.*, 2000; Ávila & Reis, 2007; Moura *et al.*, 2001). O vírus

foi detectado primeiramente na década 80 em abobrinha, em São Paulo, e somente na década de 90 em meloeiro nas principais regiões produtoras do Nordeste (Kurosawa *et al.*, 2005).

No meloeiro, o WMV causa sintomas de mosaico, rugosidade, faixa verde das nervuras, deformações e anéis necróticos (Ávila & Reis, 2007). A infecção não provoca deformações no fruto, no entanto, nos frutos maduros, observa-se mudança na coloração de manchas verdes escuras (Ávila & Reis, 2007; Lima *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011). É relatado que o WMV pode reduzir a quantidade e qualidade de frutos (Pedrosa & Faria, 1995). Isolados de WMV infectam diversas espécies de cucurbitáceas, assim como plantas de outras famílias botânicas, como Fabaceae, Malvaceae e Chenopodiaceae (Ávila & Reis, 2007). Hospedeiras alternativas podem servir de reservatório do vírus de um plantio para outro. O WMV também é classificado no gênero *Potyvirus*, como o PRSV. Esse vírus é transmitido por cerca de 38 espécies de afídeos, sendo os mais importantes *M. persicae* e *Aphis* spp., de maneira não-persistente (Purcifull *et al.*, 1984). Não foi relatada a sua transmissão por semente e o seu controle é praticamente semelhante ao de PRSV-W, com cultivares resistentes (Ávila & Reis, 2007).

**iv. Mosaico amarelo da abobrinha.** Essa doença é provocada pelo potyvírus *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). O ZYMV foi relatado em cucurbitáceas na década de 90 no Brasil (Kurosawa *et al.*, 2005), ocorrendo em diversas regiões do país (Yuki *et al.*, 2000; Moura *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2009) e do mundo (Simmons *et al.*, 2013). Os sintomas observados em meloeiro infectado por ZYMV são: severo mosaico, redução acentuada do limbo foliar (cordão de sapato), raquitismo, bolhosidade e necrose. Os frutos podem sofrer deformação, com perdas totais na produção, se a infecção ocorrer no início do ciclo vegetativo da planta (Ávila & Reis, 2007; Simmons *et al.*, 2013). O ZYMV também é classificado no gênero *Potyvirus*. Esta espécie possui uma ampla gama de hospedeiras, infectando plantas de cerca de dez famílias botânicas, além de cucurbitáceas. Como a maioria

dos potyvírus, o ZYMV é transmitido por várias espécies de afídeo de maneira não-persistente e também é transmitido mecanicamente. O controle de ZYMV ocorre principalmente através de cultivares resistentes (Kurosawa *et al.*, 2005; Ávila & Reis, 2007).

**v. Mosaico da abóbora.** Essa virose é provocada pelo comovírus *Squash mosaic virus* (SqMV). Este vírus é reconhecido mundialmente por provocar o mosaico da abóbora em muitas cucurbitáceas, incluindo o meloeiro. A sua ocorrência na cultura do meloeiro é rara, porém, ocasionalmente pode causar danos em plantios no Nordeste do país (Oliveira *et al.*, 2000; Moura *et al.*, 2001). Os sintomas induzidos pelo SqMV em meloeiro são variáveis. Em folhas mais novas observa-se clareamento de nervura e manchas escuras no limbo foliar. Em determinadas condições ambientais as plantas infectadas podem desenvolver enação foliar e frutos malformados (Ávila & Reis, 2007). O SqMV pertence ao gênero *Comovirus* classificado dentro da família *Secoviridae*. Possui genoma de RNA fita simples senso positivo, segmentando em RNA 1 e RNA 2, encapsidados em partículas separadas (ICTV, 2016). É transmitido por coleópteros crisomelídeos das espécies *Diabrotica speciosa*, *D. bivittula* e *Epilachma cacica*, cuja relação de transmissão é do tipo persistente e não circulativo. O SqMV é transmitido por semente e também mecanicamente, mas não por contato entre as plantas (Zitter *et al.*, 1996). Possui uma gama de hospedeiro restrita, infectando principalmente cucurbitáceas e alguns gêneros nas famílias *Fabaceae*, *Umbeliferae* e *Hydrophyllaceae* (Fauquet *et al.*, 2005). Como o SqMV é transmitido por semente, o seu controle ocorre principalmente pelo uso de sementes livres de vírus. Em alta infestação, é empregado inseticida para redução da população do inseto vetor (Ávila & Reis, 2007).

**vi. Clorose letal da abobrinha.** Essa virose é causada pelo tospovírus *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV). O vírus foi relatado na década de 90 em abobrinha (Pozzer *et al.*, 1996) e nos anos seguintes foi detectado em outras cucurbitáceas, como o meloeiro. Em geral,

a infecção induz sintomas de mosqueado intenso com distorções foliares e necrose apical (Ávilla & Reis, 2007). Apesar de ainda não ser um problema para o meloeiro, por não infectá-lo em condições naturais, trata-se de uma enfermidade com grande potencial destrutivo para a cultura. O não relato de ZLCV em meloeiro pode ser tentativamente explicado pela ausência do inseto vetor no campo. O ZLCV pertence ao gênero *Orthospovirus* classificado na família *Tospoviridae*. Possui genoma segmentado de RNA fita simples senso negativo (ICTV, 2016). Há relato de transmissão pelo trips *Frankliniella zucchini* de maneira circulativa-propagativa, ou seja, o vírus se replica no inseto (Giampan *et al.*, 2007).

**vii. Amarelão do meloeiro.** Esta virose é destacada como a principal doença do meloeiro atualmente e é associada ao carlavírus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) (Nagata *et al.*, 2003; Ávila *et al.*, 2008). Os primeiros relatos desta foram registrados no final da década de 90 e foi denominada pelos próprios produtores como “Amarelão do meloeiro”, sendo inicialmente considerada como uma irregularidade nutricional devido aos sintomas de clorose, característicos de deficiência de minerais (Lima *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011). Na década de 80, um distúrbio nutricional parecido com os sintomas do “Amarelão” foi observado e atribuído à deficiência de molibdênio (Faria & Pereira, 1982), sugerindo que essa virose pode estar ocorrendo há muito tempo antes da década de 90, quando foi relatada. O agente etiológico dessa doença até o momento não foi definitivamente elucidado. Historicamente, o agente etiológico foi tema de grande discussão até a hipótese de o agente causador ser o MYaV, vírus associado à doença atualmente. Primeiramente, a observação da mosca branca na cultura do meloeiro no final da década de 90 levou pesquisadores e produtores a associarem a doença do “Amarelão” com o crinivírus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), por ser transmitido por moscas-brancas e induzir sintomas parecidos em meloeiro e pepino nos Estados Unidos (Lima *et al.*, 2008; Nagata *et al.*, 2004; Kao *et al.*, 2000). No entanto, até o momento não há relatos de CYSDV no Brasil. Somente

em 2003 Nagata *et al.* relataram uma nova espécie de carlavírus em meloeiro com sintomas de “Amarelão”, o MYaV, e constataram a sua transmissão por moscas-brancas. A partir de então, estudos posteriores indicaram que o MYaV está associado à doença por induzir sintomas de clorose generalizada nas folhas após a transmissão por enxertia e pelo inseto vetor (Nagata *et al.*, 2004; 2010).

Normalmente, a expressão dos sintomas inicia-se após 30 dias do plantio, começando pelas folhas basais e alastrando-se por toda a planta. Observa-se primeiramente clorose acentuada nas folhas mais velhas e faixa verde das nervuras, mosaico (áreas de coloração verde-escuro e verde-claro) e manchas cloróticas nas folhas intermediárias. À medida que a doença avança, as folhas medianas ficam cada vez mais amareladas, atingindo as folhas mais novas. As folhas do ponteiro das plantas permanecem, geralmente, assintomáticas. Em geral, não ocorre redução no tamanho e número dos frutos de melão, mas, segundo a maioria dos produtores, ocorre uma significativa redução no teor de açúcar dos frutos, depreciando-os comercialmente e interferindo na comercialização do produto final para os mercados internos e externos (Lima *et al.*, 2015; 2011; 2008). Sintomas de amarelecimento em meloeiro são ilustrados na figura 2. Recentemente, um ensaio de campo com melões do tipo inodorus (casca amarela lisa) em que se objetivou analisar a qualidade do fruto oriundo de planta apresentando sintomas de “Amarelão do Meloeiro” demonstrou que esta doença está correlacionada negativamente com o teor de clorofila total das folhas (Costa, 2016), sugerindo que a doença pode influenciar diretamente a produtividade e/ou a qualidade dos frutos.

O MYaV pertence ao gênero *Carlavirus* da família *Betaflexiviridae*. Os membros dessa família possuem genoma de RNA fita simples senso positivo encapsidado em partícula flexuosa alongada (Adams *et al.*, 2014). Até o momento, o MYaV foi pouco estudado e o seu genoma ainda não foi completamente sequenciado. Um estudo de incidência nos principais polos de produção de melão no Nordeste mostrou que a ocorrência do MYaV é alta,

principalmente no Rio Grande do Norte (Lima *et al.*, 2009). Em 2015, Lima *et al.*, em um estudo da ocorrência do MYaV no Brasil, detectaram esse vírus por sorologia em Pernambuco, Bahia, Goiás, Alagoas, Maranhão, Rio Grande do Nordeste e no Distrito Federal. Também foi detectado em outras cucurbitáceas, em *Cucurbita* spp. e *Cucumis anguria* (Lima *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Meloeiros apresentando sintoma de amarelecimento das folhas mais velhas e medianas em lavoura de Juazeiro (BA).

As estratégias para o controle do “Amarelão” devem ser empregadas a partir de um rigoroso manejo integrado, como a eliminação de restos culturais e de plantios abandonados, tendo em vista a eliminação/redução do inseto vetor. Adicionalmente, emprega-se o uso de cobertura de tecido-não-tecido (TNT) na fase jovem para evitar a introdução do vírus nas lavouras a partir do inseto vetor (Lima *et al.*, 2009; Ávila & Reis, 2007).

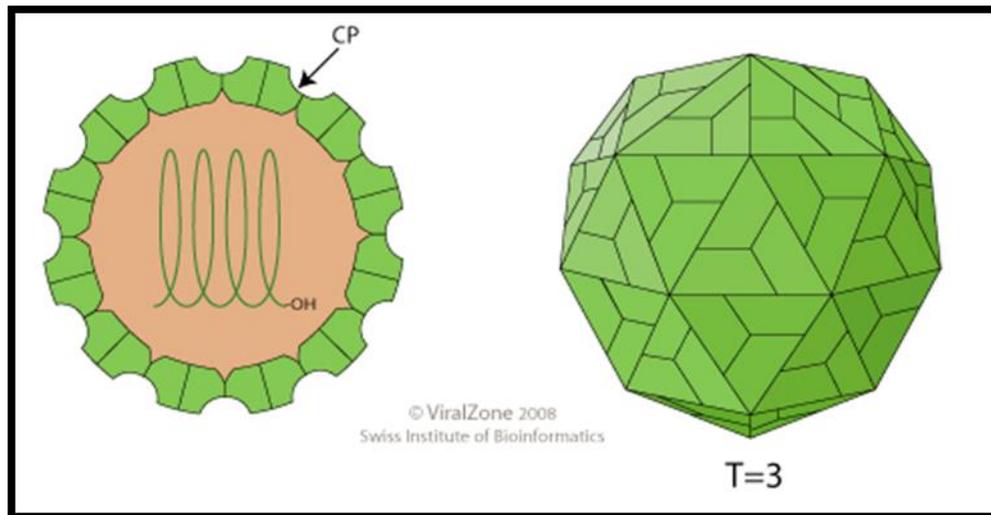
### **1.3. Família *Luteoviridae***

#### **1.3.1. Características taxonômicas e gerais da família *Luteoviridae***

A família *Luteoviridae* é composta por três gêneros (*Enamovirus*, *Luteovirus* e *Polerovirus*) reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV) e mais um ainda não definido (*unassigned*). Na família *Luteoviridae* somam-se 74 espécies, sendo o

gênero *Polerovirus* o mais numeroso, com 17 espécies (Adams *et al.*, 2014). Os vírus desta família infectam uma ampla variedade de plantas em diversas regiões do mundo.

Os requisitos principais para a classificação dos membros dentro de uma família baseiam-se nas propriedades biológicas, bioquímicas e genéticas. Com relação a *Luteoviridae*, os vírions dos vírus dessa família possuem a partícula hexagonal, icosaédrica, de 23-30 nm de diâmetro e não são envelopados. A partícula possui simetria T=3 composta por cerca de 180 proteínas da capa (**Fig. 3**). O genoma dos membros de *Luteoviridae* é de RNA fita simples senso positivo e linear. O tamanho é de cerca de 5,6-6Kb. O RNA não possui cauda poli(A) na extremidade terminal 3'. Uma pequena proteína denominada 'viral protein genome linked' (VPg) é ligada covalentemente à extremidade 5' do RNA de polerovírus e enamovírus. Possui uma capa proteica (CP) principal de 21-23 kDa que encapsida o genoma dos membros da família, sendo codificada pela ORF3. Também são observadas quantidades menores de uma proteína *readthrough*, que é proveniente da fusão entre a ORF3 e ORF5. A proteína gerada por *stop codon readthrough* ou supressão de terminação pode estar associada à transmissão de luteovirídeos por afídeo ou relacionada à estabilidade da partícula (Mayo & Ziegler-Graff, 1996; Gray & Gildow, 2003). A presença de lipídeo e/ou carboidrato na partícula não é relatada na família.



**Figura 3.** Representação esquemática da partícula de vírus do gênero *Polerovirus*. Simetria icosaédrica não envelopada de aproximadamente 23 nm de diâmetro. (foto retirada de ViralZone, <http://viralzone.expasy.org/610>).

O RNA genômico dos membros da família *Luteoviridae* codifica basicamente cinco ORFs que geram proteínas de 4 a 132 kDa. A ORF0 (não presente no gênero *Luteovirus*) forma *overlap* (sobreposição) com a ORF1 e codifica uma proteína supressora de silenciamento gênico na hospedeira. As ORFs 1 e 2 também formam *overlap* e codificam a proteína de replicação viral, a polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp). RdRp também pode ser produzido pelo *ribosomal frameshift*, resultando em proteína fusionada de ORF1-ORF2 (RdRp). Na ORF3 e ORF5, a supressão de terminação do *codon* de parada (*readthrough*) produz a CP-RTD (CP estendida), com a subunidade do capsídeo essencial para a transmissão por afídeo. A ORF4, que também se apresenta em *overlap* com a ORF3 (com exceção no RNA genômico dos enamovírus), codifica uma proteína que tem sido demonstrada atuar na movimentação viral a longas distâncias em polerovírus e luteovírus. (Mayo & Ziegler-Graff, 1996). Tem-se demonstrado em alguns membros do gênero *Luteovirus* e *Polerovirus* a presença de uma ORF6 ( $\leq 6$  kDa), que codifica uma proteína pequena com função desconhecida (Gray & Gildow, 2003). Interessantemente, tem-se observado que as proteínas de replicação codificadas pelas ORFs 1 e 2 de luteovírus não são

homólogas às proteínas codificadas por essas mesmas ORFs em polerovírus e enamovírus. As ORFs de replicação (ORFs 1 e 2) de polerovírus e enamovírus são mais parecidas com aqueles dos sobemovírus, enquanto as ORFs 1 e 2 dos outros membros de *Luteoviridae* são mais próximos com vírus da família *Tombusviridae* (Miller *et al.*, 2002; Gray & Gildow, 2003).

Com relação às propriedades imunogênicas dos luteovirídeos, a CP de membros dessa família é fortemente imunogênica (D'Arcy *et al.*, 2000). As espécies dentro de um gênero estão mais intimamente relacionadas sorologicamente do que as espécies de gêneros diferentes (Martin & D'Arcy, 1990).

Os membros da família *Luteoviridae* infectam grupos restritos de hospedeiras, porém há alguns vírus que infectam diversas espécies em diferentes famílias botânicas. Por exemplo, o luteovírus *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) e o polerovírus *Cereal yellow dwarf virus* infectam plantas da família Poaceae (Jiménez-Martínez *et al.*, 2004), enquanto os luteovírus *Bean leafroll virus* e *Soybean dwarf virus* infectam principalmente leguminosas (Domier *et al.*, 2002). Em contraste, o polerovírus *Beet western yellows virus* (BWYV) apresenta um amplo círculo de hospedeiros, infectando mais de 150 espécies de plantas em mais de 20 famílias (Martin & D'Arcy, 1990; Hauser *et al.*, 2000).

Luteovirídeos são relatados nas regiões árticas, temperadas, tropicais e subtropicais. Algumas espécies são relatadas em todo o mundo, como BYDV, BWYV e o *Potato leafroll virus* (PLRV). Outras espécies possuem distribuição mais restrita, como o *Tobacco necrotic dwarf virus* (gênero *Luteovirus*), o qual tem sido relatado somente no Japão, e o *Groundnut rosette assistor virus* (gênero *Luteovirus*), que foi relatado nos países do Sul do Saara na África (Warren *et al.*, 2005; Valkonen, 2007).

A transmissão de membros de *Luteoviridae* ocorre de forma circulativa, não propagativa, por espécies específicas de afídeo (D'Arcy *et al.*, 2000). O afídeo insere o

estilete no floema da planta e suga a seiva contendo partículas virais. Então, os vírus são adquiridos durante a alimentação a partir do floema, entram no hemocele do afídeo através do intestino anterior (no caso do isolado BYDV-PAV) ou através do intestino médio posterior (no caso do PLRV) por meio de um processo mediado por um receptor. Então, os vírus circulam na hemolinfa e entram na glândula salivar acessória por um segundo evento de transporte também mediado por receptor. A inoculação resulta da introdução da saliva contendo partículas virais no tecido do floema através do ducto salivar durante a alimentação do afídeo (D'Arcy et al., 2000; Gray & Gildow, 2003). A interação com proteínas tipo GroEL produzidas pelos endossimbiontes e partículas virais de PRLV no hemocele de afídeo foi relatado (Van den Heuvel *et al.*, 1994). Acredita-se que esta interação é importante na proteção de partículas virais no hemocele para os vírus que não se propagam no inseto vetor. As principais espécies de afídeo transmissoras são *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* (Cilia *et al.*, 2011). O único caso de transmissão mecânica é a do enamovírus (*Luteoviridae*) *Pea enation mosaic virus 1* (PEMV-1) quando co-infectado com o umbravírus (*Tombusviridae*) *Pea enation mosaic virus 2* (PEMV-2) (D'Arcy *et al.*, 2000).

Com relação ao local de replicação de membros de *Luteoviridae*, já foi relatado que partículas de luteovírus e de polerovírus ficam confinadas em células do floema (Peter *et al.*, 2009). O PEMV-1 em infecção com o PEMV-2 é encontrado em células do floema e do mesófilo (D'Arcy *et al.*, 2000). As partículas de vírus são encontradas no núcleo e no citoplasma das células infectadas. Luteovírus e polerovírus muitas vezes provocam necrose do floema impedindo a translocação de elementos celulares, que induz a perda de clorofila resultando em clorose das folhas, o que desfavorece o crescimento da planta infectada (D'Arcy *et al.*, 2000; Miller & White, 2006).

Uma das principais características da família *Luteoviridae* é que os seus membros não são transmitidos mecanicamente a partir de um extrato oriundo de planta infectada. No

entanto, há casos de interação viral em que ocorre transmissão mecânica. Por exemplo, a transmissão mecânica de PLRV é observada em batata e em *Nicotiana clevelandii* quando está em infecção mista com o PEM-2 (*Umbravirus*) (Mayo *et al.*, 2000), indicando mutualismo entre essas duas espécies de vírus. Isso também ocorre entre o polerovírus PEM-1 em infecção mista com o PEM-2 (Mayo & D’Arcy, 1999; D’Arcy *et al.*, 2000).

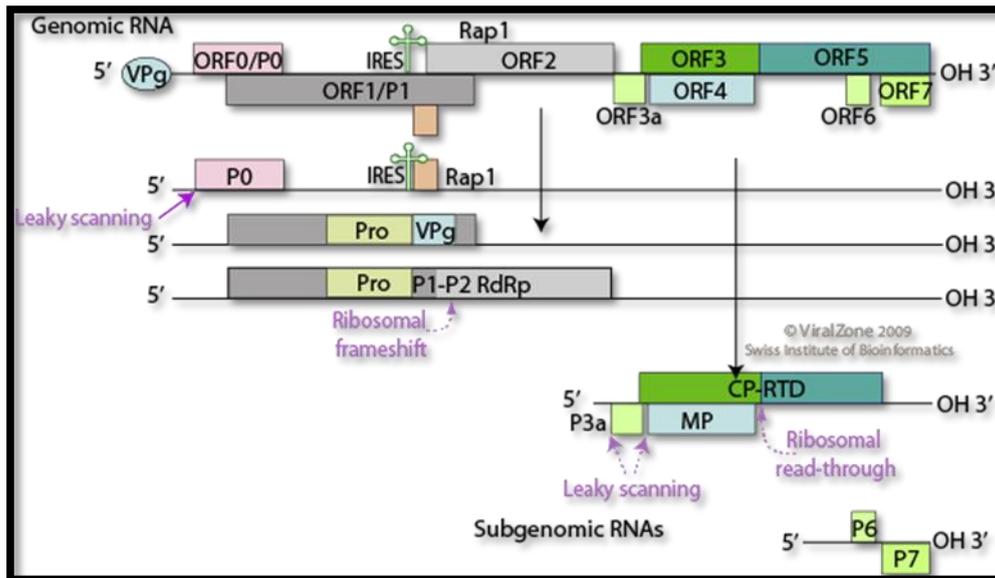
O afídeo insere o estilete no floema da planta e suga a seiva contendo partículas virais. Em seguida, os virions atravessam o intestino médio e são liberados para a cavidade do corpo do inseto (hemocele) para circular na hemolinfa. As partículas presentes na hemolinfa associam-se às glândulas salivares acessórias e posteriormente são transportadas pelo ducto do estilete para plantas hospedeiras (Van den Heuvel *et al.*, 1994). Essa associação viral com insetos hospedeiros deve-se a interação com proteínas tipo GroEL (homólogas às de *Escherichia coli*) produzidas pelos endossimbiontes (Van den Heuvel *et al.*, 1994). As principais espécies de afídeo transmissoras são *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* (Cilia *et al.*, 2011).

### **1.3.2. Gênero *Polerovirus***

O gênero *Polerovirus* é constituído por 17 espécies definitivas e aceitas pelo ICTV, sendo o mais numeroso da família *Luteoviridae* (Veerakone *et al.*, 2015). A espécie-tipo desse gênero é o *Potato leafroll virus*. Membros de polerovírus infectam diferentes hospedeiras

Existem quatro critérios utilizados para demarcar espécies dentro do gênero *Polerovirus*: (i) diferença de amplitude e especificidade na gama de hospedeiros; (ii) impossibilidade de proteção cruzada em interações unidirecionais e bidirecionais; (iii) especificidade sorológica (anticorpo monoclonal e policlonal); e (iv) diferença superior a 10% de identidade da sequência em aminoácido de qualquer gene (Veerakone *et al.*, 2015; D’Arcy *et al.*, 2000).

O componente genômico de membros de *Polerovirus* é um importante diferencial do gênero entre os demais da família. Os polerovírus possuem RNA de fita simples, linear, monopartido, senso positivo, sem cauda poli(A) na extremidade 3', com tamanho variando entre 5,3-5,9 Kb, contendo as seguintes ORFs (Fig. 3; Jaag *et al.*, 2003): ORF0 codifica a P0 que atua como supressora da maquinaria de silenciamento gênico da hospedeira; ORF1 codifica uma proteinase (Pro) e uma VPg, que atua como um *primer* durante a síntese de RNA viral pela RdRp. ORF2 tem duas formas de tradução: uma com *ribosomal leaky scanning* em outro frame que não seja igual do ORF1 em forma de sobreposição com ORF1. Outro é de ribosomal *frame shift* devido a sequencia Slippy hexamer de GGGAAAC; ORF3a possui a iniciação de tradução não canônica (começa com AGC) e tem função essencial de movimentação viral a longa distância (Smirnova *et al.*, 2015); ORF3 e ORF5, por *ribosomal read-through*, codificam a CP-RTD (CP-Read Through Domain), com uma subunidade do capsídeo útil para a transmissão por afídeo (Jaag *et al.*, 2003; Knierim *et al.*, 2013); ORF4 encontra-se interna à ORF3 e codifica a proteína de movimento (MP) célula a célula; ORF6 e ORF7 são traduzidos a partir de RNAs subgenômicos e não possuem função conhecida (**Fig. 3**). O RNA é encapsidado em partícula com simetria icosaédria (T=3), não envelopada, com diâmetro de 25-30 nm constituído por cerca de 180 proteínas da capa. O material genômico de polerovírus, interessante, é mais complexo e diferente comparado com os outros gêneros da família, porém é muito semelhante ao de um enamovírus. Um diferencial no RNA de polerovírus e de enamovírus é a presença da VPg ligada na sua extremidade 5'. Entretanto, o RNA de polerovírus codifica a MP (ORF4) dentro da ORF3 (**Fig. 3**), que o distingue de um enamovírus. Adicionalmente, a ORF4 (MP) não é presente nos enamovírus (Knierim *et al.*, 2013)



**Figura 3.** Representação esquemática do RNA genômico dos vírus do gênero *Polerovirus*. O genoma de RNA contém VPg na extremidade 5', composto por nove "Open Reading Frames" (ORFs) que codificam as proteínas representadas pelas seguintes siglas: ORF0: proteína P0; ORF1: proteína P1 que contém os motivos da protease (Pro) e VPg; ORF2: proteína 2 que contém os motivos da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); ORF3: capa proteica (CP); ORF5: capa proteica gerada por "Read-Through Domain" (CP-RTD); ORF4: proteína de movimento; ORF3a: proteína essencial de movimento em longa distância; ORF6 e ORF7 codificam. Ilustração retirada do site ViralZone (viralzone.expasy.org).

Com relação à expressão dos genes de polerovírus, por ser sentido positivo (ssRNA +), o genoma já é infeccioso, ou seja, ao introduzir o material genético na célula, o RNA genômico já atua como RNA mensageiro viral e é traduzido. P0, P1 (Pro) e P2 (RdRp) são traduzidas a partir do genoma sentido positivo e P3a, CP (inclusive CP-RTD) e MP são traduzidas por RNA subgenômico maior e P6 e P7 (com funções desconhecidas) são produzidas por RNA subgenômico menor.

De acordo com Knierim *et al.* (2013), a replicação dos polerovírus ocorre no citoplasma, mas sem informação de associação a alguma organela da célula hospedeira. Basicamente, o vírus penetra no interior da célula através do estilete do inseto vetor. Em seguida, ocorre a decapsidação da partícula e o seu material genético é liberado no citoplasma.

Os vírus podem mudar geneticamente devido a mutações em ponto ou recombinações.

Várias espécies de polerovírus foram descritas como resultantes de eventos de recombinação, sendo um mecanismo comum em toda a família *Luteoviridae* (Moonan *et al.*, 2000; Pagán & Holmes, 2010). A recombinação viral consiste na troca de material genético entre dois (ou mais) genomas. Um recombinante entre *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) e *Melon aphid-borne yellows virus* (MABYV) na região intergênica (IR) entre a ORF2 e ORF3 foi relatado em Taiwan (Knierim *et al.*, 2010). Posteriormente, foram relatadas recombinação de *Suakwa aphid-borne yellows virus* (SABYV) com o MABYV (Knierim *et al.*, 2013) e entre o *Pepo aphid-borne yellows virus* (PABYV) com CABYV (Ibaba *et al.*, 2016). Os pontos de recombinação foram identificados na região intergênica em ambos os casos.

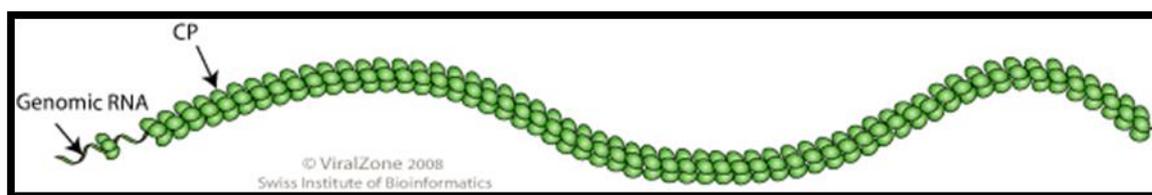
Além disso, em polerovírus, há evidências de que eventos de recombinação entre as suas espécies tenham provocado mudanças na capacidade de infectar determinadas hospedeiras. Dombrovsky *et al.* (2013) relataram um novo polerovírus detectado em pimenta em Israel, denominado Pepper yellow leaf curl virus (PYLCV) que apresenta um evento de recombinação com os polerovírus de cucurbitáceas *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) e *Tobacco vein-distorting virus* (TVDV). Esse caso demonstra o efeito, neste caso positivo ao vírus, desse mecanismo com a ampliação da gama de hospedeiros que o vírus é capaz de infectar. Além disso, há relatos em que recombinações nas CPs de polerovírus têm provocado mudanças na especificidade do afídeo transmissor, podendo haver troca de espécie do inseto, como no caso do *Pepper vein yellows virus* (PeVYV; Murakami *et al.*, 2011).

#### **1.4. Família *Betaflexiviridae***

##### **1.4.1. Características taxonômicas gerais da família *Betaflexiviridae***

A família *Betaflexiviridae* é constituída pelas subfamílias *Quinvirinae* e *Trivirinae*. A subfamília *Quinvirinae* é composta por três gêneros (*Carlavirus*, *Foveavirus* e *Robigovirus*) e um gênero ainda não estabelecido. A subfamília *Trivirinae* é composta por oito gêneros

(*Capillovirus*, *Chordovirus*, *Citrivirus*, *Divavirus*, *Prunevirus*, *Tepovirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus*). Membros da família *Betaflexiviridae* possuem partícula flexuosa e filamentosa não envelopada de aproximadamente 12-13 nm em diâmetro e de 600 a mais de 1000 nm de comprimento (**Fig. 4**), dependendo do gênero. O material genético das espécies dessa família é constituído de RNA fita simples senso positivo com cerca de 5,9 a 9 Kb, contendo cauda poli (A) na extremidade final 3' (ICTV, 2016).



**Figura 4.** Esquema do virion da família *Betaflexiviridae* retirado do ViraZone (2008). Estrutura filamentosa com diâmetro de 12-13 nm e 600-1000 nm de comprimento. Fonte: ViralZone (viralzone.expasy.org).

O genoma possui cerca de três a seis genes, dependendo do gênero, porém a ORF1 de todos os membros da família codifica uma polimerase essencial para a replicação do RNA. Esta proteína (190-250 kDa) contém o domínio conservado para a atividade da Metiltransferase (Mtr), Helicase (Hel) e RdRp. A maioria dos membros possui domínio para as proteases papain-like (P-Pro) e *Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase* AIKB entre a Mtr e Hel. As proteínas dos três “triple gene block” (TGB1, TGB2 e TGB3) codificam as proteínas envolvidas no movimento célula-a-célula. Na extremidade 3' do genoma são codificadas a CP e, em algumas espécies, a proteína de afinidade a ácidos nucleicos (*RNA-binding protein*, RBP) (Adams *et al.*, 2013). No gênero *Vitivirus*, foi demonstrada que a NABP tem atividade de supressora de silenciamento gênico (Deng *et al.*, 2015).

Os vírus desta família são relatados infectando uma ampla diversidade de plantas hospedeiras, no entanto, individualmente a gama de hospedeira das espécies é limitada. Alguns membros desta família infectam principalmente plantas lenhosas. Muitos destes vírus

provocam sintomas suaves nas suas hospedeiras. A transmissão dos membros de *Betaflexiviridae* pode ser por ácaro e afídeo e mecânica (Carstens *et al.*, 2010). Na célula da hospedeira, esses vírus se acumulam no citoplasma e alguns podem causar inclusões ovoides ou de forma irregular, mas de modo geral, não induzem estruturas citopáticas (Adams *et al.*, 2013).

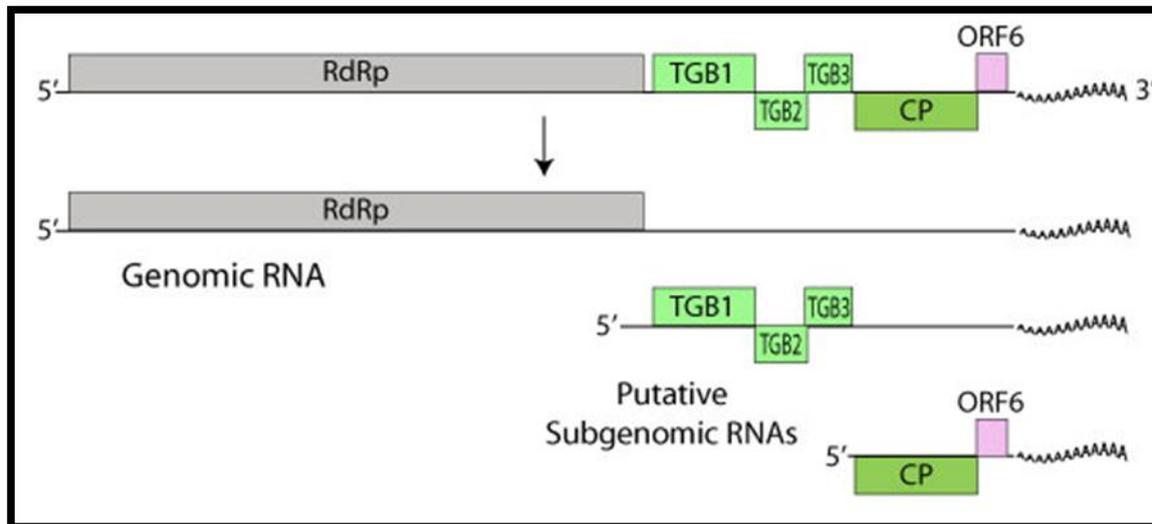
Os critérios de demarcação dos gêneros em *Betaflexiviridae* são a hospedeira natural das espécies, especificidade sorológica e porcentagem de identidade de 72% em nucleotídeo (ou 80% de identidade de aminoácido) baseado na CP ou na polimerase (Adams *et al.*, 2014).

#### 1.4.2. Gênero *Carlavirus*

O gênero *Carlavirus* possui 47 espécies aceitas como definitivas pelo ICTV, sendo a espécie-tipo o *Carnation latent virus* (CLV). Essas espécies são encapsidadas em partícula com simetria helicoidal e flexuosa de aproximadamente 610-700 nm de comprimento e 12-15 nm de diâmetro.

O genoma de carlavírus é constituído por uma molécula de RNA fita simples senso positivo (ssRNA+) de aproximadamente 7,4 a 7,7 Kb. Algumas espécies podem apresentar RNAs subgenômicos (sgRNAs) de 2,1-3,3 Kb e 1,3-1,6 Kb, os quais são possivelmente encapsidados em partículas mais curtas. O RNA genômico contém uma cauda poli (A) na extremidade final 3'. A organização genômica de carlavírus possui tipicamente seis ORFs com regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3'. Em *Potato virus M* (PVM), a ORF1 codifica um polipeptídeo de 223 kDa responsável pela replicação viral. As ORFs 2, 3 e 4 codificam os genes que formam os TGBs de 25, 12 e 7 kDa, respectivamente, envolvidos na movimentação viral. A ORF5 codifica a CP de 34 kDa e encontra-se em sobreposição com a ORF6, o qual codifica uma proteína de 11-16 kDa rica em cisteína, denominada como *RNA-binding protein* (RBP) (**Fig. 5**; Adams *et al.*, 2013). A RBP interage com RNA, supostamente

envolvida na transmissão pelo afídeo vetor, e está associada à transcrição de genes da hospedeira, supressão de silenciamento ou envolvida na replicação do RNA viral (Deng *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Representação esquemática da organização genômica dos membros do gênero *Carlavirus*. O genoma de RNA deste gênero contém cauda poli (A) na extremidade 3', composto por nove "Open Read Frames" (ORFs) que codificam as proteínas representadas pelas seguintes siglas: ORF1: RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); ORF2: Bloco triplo de gene 1 (TGB1); ORF3: Bloco triplo de gene 2 (TGB2); ORF4: Bloco triplo de gene 3 (TGB3); ORF5: capa proteica (CP); ORF6: proteína de ligação a RNAs (RBP). Fonte: ViralZone (viralzone.expasy.org).

Somente a ORF1 é traduzida a partir do RNA genômico (Adams *et al.*, 2013). Em *Blueberry scorch virus*, e provavelmente em outros carlavírus, o produto da ORF1 é processada proteoliticamente por uma proteinase "papain-like" (Lawrence *et al.*, 1995). As ORFs presentes na região 3' do genoma são traduzidas a partir de sgRNAs, podendo serem encontrados em tecido infectado e, para algumas espécies, podem ser detectados em preparações de purificação viral (Adams *et al.*, 2013). Em *Potato virus S* (PVS), a região 5' UTR e o sgRNA da CP estão relacionados com a potencialização de expressão proteica (Turner *et al.*, 1999).

A infecção de algumas espécies de carlavírus ocorre após a desencapsidação do RNA

genômico no citoplasma. Primeiramente, a polimerase é expressa e em seguida auxilia na replicação do genoma viral. Promotores internos subgenômicos são utilizados para a transcrição de sgRNAs. A tradução das ORFs dos sgRNAs gera a proteína de capsídeo e movimento. Capsídeos formados contendo o RNA genômico são transportados célula-a-célula pelos TGBs (Adams *et al.*, 2013).

A replicação dos carlavírus ocorre nas células do parênquima do hospedeiro e por este motivo são facilmente transmitidos mecanicamente (Matelli *et al.*, 2007). Os sintomas induzidos por carlavírus variam de muito leve à grave, dependendo das condições ambientais, variedade da planta, estirpe ou espécie dos vírus, como observado, principalmente, em carlavirose de batata (Nie *et al.*, 2008). Também, muitas vezes, são observadas infecções assintomáticas (Matelli *et al.*, 2007). Espécies de carlavírus podem provocar efeitos citopáticos na célula hospedeira. Os virions transmitidos por afídeo se acumulam no citoplasma e formam agregados semelhantes a membranas. Algumas espécies podem induzir inclusões ovóides ou de formas irregulares que são observados sob o microscópio de luz como corpos vacuolados. Partículas do carlavírus transmitidos por moscas-brancas, *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV), também ocorrem em agregados no citoplasma. Isolados de CPMMV podem produzir agregados em formato de pincel (Adams *et al.*, 2013).

A distribuição geográfica de algumas espécies de carlavírus é restrita, mas as que infectam culturas propagadas vegetativamente são amplamente distribuídas, supostamente devido à propagação inadvertida de propágulos germinativos. A maioria das espécies ocorre em climas temperados, mas o CPMMV e MYaV estão restritos a regiões tropicais e subtropicais (Adams *et al.*, 2013).

No Brasil entre as espécies de carlavírus relatadas estão o *Potato virus S* infectando batata (*Solanum tuberosum*) (Gaspar *et al.*, 2008), *Cole latent virus* em couve (Gaspar *et al.*, 2008), o CPMMV em feijão (Costa *et al.*, 1983) e soja (Almeida *et al.*, 2003; 2005; 2008),

*Garlic common latent virus* em alho (Farjado *et al.*, 2001), *Lily symptomless virus* em lírio (Rivas, 2010) e o MYaV em melão (Nagata *et al.*, 2003).

Com relação à transmissão, muitas espécies de carlavírus são transmitidas naturalmente por afídeo de maneira não persistente (Pirone & Perry, 2002). Somente dois carlavírus são relatados transmitidos por mosca-branca: o CPMMV (Naidu *et al.*, 1998) e o MYaV (Nagata *et al.*, 2003). A transmissão de CPMMV por mosca-branca ocorre de forma não persistente (Naidu *et al.*, 1998) e a transmissão do MYaV não foi estudada detalhadamente. *Red clover vein mosaic virus* e o CPMMV são relatados como sendo transmitidos semente para hospedeiras leguminosas (Brunt & Kenten, 1974; Mink, 1993). Todos são transmitidos mecanicamente, com exceção o MYaV, e alguns podem ser transmitidos de forma mecânica (CLV e PVS) no campo, com facilidade de levar a uma epidemia (Tropics & Patancheru, 1983; Adams *et al.*, 2013).

Para demarcação de espécie do gênero *Carlavirus*, espécies distintas devem apresentar menos de cerca de 72% de identidade em nucleotídeo (ou 80% em aminoácido) entre os genes da CP ou polimerase (Adams *et al.*, 2013).

### **1.5. Sequenciamento de nova geração (NGS) e exemplos de seu uso na identificação de vírus associados a doenças em plantas**

A aplicabilidade do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) na virologia vegetal tem se destacado como uma ferramenta de diagnose em massa, destacando-se também na detecção em larga escala de outros patógenos (fungo, nematoide, bactéria, micoplasma, etc.). Essa ferramenta também é importante para detecção rápida de novos patógenos ainda desconhecidos associados a grandes culturas. Aliando isso a doenças de plantas que não se sabe o agente etiológico, o NGS torna-se muito importante para promover pesquisas com essas doenças pouco estudadas, acarretando em novas informações para o desenvolvimento de

medidas de controle.

O sequenciamento de nova geração, Next Generation Sequencing (NGS), é definido pelo emprego de plataformas que permitem o sequenciamento massal de amostras, gerando uma enorme quantidade de *reads* (sequências) em um curto intervalo de tempo. O surgimento desta tecnologia deveu-se à necessidade de sequenciamento, inclusive de genomas, de uma maneira mais econômica, eficaz e rápida em comparação com o sequenciamento automatizado nos modelos de Sanger de “primeira geração” (Barba *et al.*, 2014).

Diferentes plataformas realizam o sequenciamento de nova geração. Segundo Barba *et al.* (2014), a primeira plataforma a ser lançada foi a 454 Life Sciences, em 2004, que prometia custos até seis vezes menores em comparação com o sequenciamento de primeira geração. Depois de a plataforma 454 Life Sciences ser adquirida pela empresa Roche Company, muitas mudanças foram feitas de modo que a cada novo lançamento tornava-se possível a obtenção de uma maior quantidade de dados, que inicialmente era de 20 milhões de pares de bases até chegar em 600 milhões na plataforma 454 GS-FLX + Titanium. A partir de então, foram desenvolvidas outras plataformas com desempenho mais aprimorado de sequenciamento. Como a plataforma Solexa Genome Analyzer (GA), desenvolvida em 2005, e posteriormente adquirida pela Illumina. Esta, após 2007, lançou a GAIIx com uma geração de mais de 50 bilhões de pares de bases por corrida. Desde então, a Illumina disponibilizou no mercado diferentes plataformas cada vez mais eficientes, garantindo cada vez maior quantidade de *reads* em menores tempos de corrida.

O sequenciamento de nova geração tem sido aplicado em larga escala na área de virologia de plantas. O desenvolvimento de diferentes tecnologias de NGS com o avanço nas análises de bioinformática constitui-se em uma ferramenta importante para a determinação de sequências genômicas virais presentes em qualquer tecido, sem prévio conhecimento das suas propriedades ou sequências. Por exemplo, Mollov *et al.* (2016) utilizaram a plataforma

Illumina HiSeq 2500 para sequenciar o genoma completo do *Ramu stunt virus*, gênero *Tenuivirus*, que infecta a cana-de açúcar em Papua-Nova Guiné. Nesse trabalho o RNA total foi extraído de plantas infectadas e o sequenciamento do transcriptoma do tipo “shotgun” foi realizado. Um total de 18 mil *contigs* foi gerado usando o programa CLC Genomics Workbench (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os *contigs* foram submetidos a análise por BLASTX. Vinte e um *contigs* foram relacionados a vírus e oito associados especificamente aos vírus que infectam plantas. RT-PCR e sequenciamento Sanger foram realizados com intuito de validar os resultados do NGS.

Esta mesma tecnologia tem sido usada para detecção de novas espécies virais através do sequenciamento de ácidos nucleicos contidos nos vetores dos vírus. Nouri *et al.* (2016) utilizaram a metagenômica para analisar sequências virais associadas a populações de *Diaphorina citri*, vetor do agente causal da doença *Huanglongbing* (HLB). Quatro bibliotecas de pequenos RNAs (sRNA) foram geradas a partir de 2µg de RNA total extraído do vetor e utilizados para o sequenciamento pela plataforma Illumina HiSeq 2000. Além disso, o sequenciamento total de RNA (RNA-seq) foi utilizado como estratégia para o aumento da cobertura do genoma viral. As análises de bioinformática foram realizadas utilizando o programa Velvet (Zerbino e Birney, 2008) e o programa CLC Assembly Cell (Qiagen), com k-mers variando entre 15-19 e 45-65, para sRNA e RNA-seq, respectivamente. Foram identificadas novas sequências virais pertencentes às famílias *Reoviridae*, *Parvoviridae* e *Bunyaviridae* (atualmente *Bunyavirales*) e um vírus de RNA de fita simples de senso positivo ainda não classificado. Esta foi a primeira pesquisa abrangente para avaliar a comunidade viral de populações mundiais de uma praga de insetos agrícolas. Os resultados forneceram informações valiosas sobre possíveis novos vírus, alguns dos quais podem ter potencial para ser usados como agentes de biocontrole.

# CAPÍTULO 2

---

---

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM NOVO  
RECOMBINANTE INTERESPECÍFICO DE *Cucurbit aphid-borne  
yellows virus* EM MELOEIRO NO BRASIL**

# CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM NOVO RECOMBINANTE INTERESPECÍFICO DE *Cucurbit aphid-borne yellows virus* EM MELOEIRO NO BRASIL

Thiago Marques Costa, Rosana Blawid, Miguel A. Aranda, Débora Freitas, Genira Andrade, Alice Nagata, Tatsuya Nagata

## RESUMO EXPANDIDO

Plantas de meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão do meloeiro”, coletadas no estado do Rio Grande do Norte e Bahia, Brasil, foram analisadas por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para a determinação dos vírus presentes nessas plantas. O carlavírus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) é considerado como o principal agente etiológico da doença e nesta análise objetivou-se verificar se a presença do MYaV estaria associada a plantas sintomáticas e se outros vírus, potenciais candidatos a agente etiológico, poderiam estar presentes em meloeiro com sintoma de clorose na região Nordeste. Como esperado, a partir da comparação de sequências obtidas de preparações de RNA total dessas plantas, sequências homólogas ao genoma do de MYaV foram detectadas. Adicionalmente, sequências compatíveis com o polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) também foram obtidas em alta frequência. A seguir, o genoma de dois isolados de CABYV brasileiro foi montada por sequenciamento Sanger a partir de fragmentos obtidos por RT-PCR. Esses isolados foram denominados M3, de Mossoró (RN), e JMB1, de Juazeiro (BA). A sequência completa do genoma dos dois isolados brasileiros apresentou identidade em nucleotídeo de 96,8% entre eles. Ambas as sequências compartilharam 73,7% de identidade em nucleotídeo com o isolado CABYV-N da França. A análise de recombinação feita com o programa RDP4 detectou uma potencial região recombinante na extremidade 3'. Uma análise detalhada dessa recombinação confirmou que o isolado CABYV brasileiro é um recombinante entre um isolado de CABYV, como o *major parent*, e o *minor parent* um polerovírus desconhecido. Uma análise do relógio molecular baseada no gene da ORF0, que codifica a proteína P0, conservada em polerovírus, indicou que o CABYV foi possivelmente introduzido no Brasil aproximadamente há 68 anos. Este vírus é um candidato forte como agente causador da doença “Amarelão do meloeiro” observada em plantas de meloeiro no Nordeste do Brasil.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo*, Next Generation Sequencing, *Polerovirus*.

# ***Cucurbit aphid-borne yellows virus* FROM MELON PLANTS IN BRAZIL IS AN INTERSPECIFIC RECOMBINANT**

**Thiago Marques Costa, Rosana Blawid, Miguel A. Aranda, Débora Freitas, Genira Andrade, Alice Nagata, Tatsuya Nagata**

## **ABSTRACT**

Melon plants with symptoms of severe yellowing collected in the states of Rio Grande do Norte and Bahia, Brazil, were analyzed by high-throughput sequencing to identify the viruses present in these plants. The carlavirus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) is considered the major etiologic agent of the disease and this analysis aimed to verify if MYaV sequences would be present in the symptomatic plants, as well as other potential viruses. As expected, sequences homologous to the genome of MYaV were frequently detected from the RNA preparations of these plants. In addition, the polerovirus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) sequences were also retrieved in a high frequency. Then, two draft CABYV genome sequences were assembled from Sanger sequenced genome segments from fragments amplified by RT-PCR. These isolates were named M3, from Mossoró (Rio Grande do Norte), and JMB1, from Juazeiro (Bahia). The complete genome of the two isolates shared 96.8% nucleotide identity. Both sequences shared 73.7% nucleotide identity with the CABYV-N isolate from France. Recombination analysis performed by RDP4 detected a potential recombinant region in the 3' terminal region. A detailed analysis of the genome confirmed that this virus was a recombinant between CABYV, as the major parent, and an unknown polerovirus as the minor parent. A molecular-clock analysis based on the ORF0, that encodes the polerovirus conserved P0 protein, suggested that CABYV was possibly introduced into Brazil ~68 years ago. This virus is a strong candidate as the cause of the severe yellowing disease in melon plants in Brazil.

**Keywords:** *Cucumis melo*, Next Generation Sequencing, *Polerovirus*.

## 2.1. INTRODUÇÃO

A doença conhecida como o “Amarelão do meloeiro” é um dos maiores problemas para o cultivo de meloeiro no Nordeste do Brasil. Esta doença foi primeiramente relatada no Brasil em 1997 (Santos *et al.*, 2008), com incidência alta e com alta chance de ter um vírus como agente causador. A etiologia ainda não foi totalmente elucidada, apesar da importância da doença. O meloeiro é cultivado em cerca de 25.000 ha na região, produzindo frutos destinados à exportação e também ao mercado interno. Devido à alta infestação de moscas-brancas na cultura do meloeiro e à baixa ocorrência de outros vetores virais potenciais, acredita-se que as moscas-brancas sejam os transmissores mais prováveis do vírus que causa a doença. Essa doença primeiramente foi associada a um crinivírus, mas até o momento não foi detectado nenhum crinivírus em meloeiro no Brasil. A presença de um carlavírus transmissível por mosca-branca foi posteriormente confirmada após ter sido detectado em plantas de meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão”, que foi nomeado de *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) (Nagata *et al.*, 2003). A sequência completa do genoma confirmou ser este vírus um membro do gênero *Carlavirus* (capítulo 3).

Neste estudo, foi empregada a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) para identificar os vírus presentes em amostras de meloeiro apresentando sintomas severos de “Amarelão”. Foi encontrado, em adição a sequências compatíveis com o MYaV, em alta frequência sequências de um vírus com alta identidade de sequência ao vírus cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV). O CABYV foi relatado pela primeira vez na França (Lecoq *et al.*, 1992) e foi posteriormente detectado em outros países: Espanha (Juarez *et al.*, 2004), Itália (Tomassoli e Meneghini, 2007), Turquia (Yardimci e Özgönen, 2007), Egito (Omar e Bagdady 2012), Arábia Saudita (Al-Saleh *et al.*, 2015), Irã (Bananej *et al.*, 2006), Coreia do Sul (Choi e Choi, 2015; Choi *et al.*, 2015), China (Xiang *et al.*, 2008), Japão (GQ221224) e EUA (GU002335).

CABYV é um polerovírus transmitido pelos afídeos *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* (Lecoq *et al.*, 1992). O CABYV infecta naturalmente meloeiro, pepino, abóbora e melancia, sendo um vírus confinado ao floema. Outras hospedeiras não cucurbitáceas são alface (*Lactuca sativa*) e beterraba forrageira (*Beta vulgaris*) (Lecoq *et al.*, 1992). Este vírus é frequentemente encontrado em infecções mistas com outros vírus que infectam plantas de cucurbitáceas, especialmente os potyvírus que compartilham insetos vetores comuns (Minari-Hattab *et al.*, 2009; Kassem *et al.*, 2007). Aqui se descreve uma análise completa do genoma de duas variantes de CABYV de amostras coletadas em duas regiões do Brasil. A distribuição espaço-temporal dos dois isolados brasileiros de CABYV caracterizados também é descrita.

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. Obtenção das amostras de meloeiro**

A coleta das amostras foi realizada em 2015 em dois locais distantes mais de 800 Km em dois estados no Nordeste do Brasil: Ceará (CE, perto da cidade de Mossoró) e Bahia (BA, Juazeiro). Vinte e duas amostras foliares de meloeiro apresentando sintomas de “amarelão” foram coletadas em diferentes pontos das áreas de plantio (exemplo na Figura 1). Em seguida, as amostras foram identificadas e armazenadas a – 80° C nas dependências do laboratório de Virologia Geral, localizado no Departamento de Biologia Celular na Universidade de Brasília.



**Figura 1.** Plantas de meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão do meloeiro” nas folhas mais velhas as quais foram coletadas para determinação dos vírus presentes na planta.

### **2.2.2. Semi-purificação de partículas virais e preparação do RNA para NGS**

Foi realizada a purificação parcial de vírus para obtenção de partículas virais, de acordo com Blawid et al., (2017), com algumas adaptações. Para isso, 44 gramas de tecido de plantas sintomáticas foram pulverizadas em nitrogênio líquido. Em seguida, o macerado foi homogeneizado em tampão fosfato (pH 8,0) contendo 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol e filtrado com gaze. O filtrado foi centrifugado a 3836 x g por 30 minutos para remover detritos do tecido e o sobrenadante foi tratado com Triton X-100 (concentração final de 1%) sob agitação a 6° C por 1h. Após isso, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 142000 x g por 1h a 6° C sob um colchão de sacarose a 20%.

O *pellet* obtido na semi-purificação foi submetido à extração de RNA total utilizando o kit ZR Plant RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O RNA ribossomal foi removido do RNA total extraído com o kit Plant Leaf RiboZero (Illumina, Seoul, Coréia do Sul) e em seguida uma biblioteca de cDNA foi

construída usando o kit TruSeq (Illumina) pela MacroGen Inc. (Seoul, Coréia do Sul)..

### **2.2.3. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática**

A biblioteca de cDNA foi sequenciada na plataforma Illumina HiSeq 2000 com 100 pb *paired-end*. As sequências pequenas obtidas (*reads*) foram armazenadas no computador de trabalho. As regiões consideradas de baixa qualidade de cada *read* foram eliminadas utilizando o programa Trimmomatic v.036 (Bolger *et al.*, 2014). As sequências resultantes foram utilizadas para montagem da sequência consenso nos montadores Velvet v.1.2.10 (Zerbino *et al.*, 2009) e SPAdes v. 3. 9 (Bankevich *et al.*, 2012) de maneira a se obter os *contigs*. Os *contigs* gerados foram submetidos à análise do programa tBLASTx contra um banco de dados com sequências referências de vírus (RefSeq - GenBank) e os *contigs* relacionados com vírus de plantas foram selecionados. A análise das sequências foi realizada pelo programa Geneious 8.1.

A sequência quase total obtida pelo método NGS do genoma do poliovírus estudado neste trabalho foi utilizada para desenhar *primers* específicos para detecção do vírus nas plantas e determinação da sequência do genoma completo por sequenciamento Sanger.

### **2.2.4. RT-PCR para validação dos dados de NGS**

#### **2.2.4.1. Determinação da sequência do genoma completo de dois isolados (M3 E JMB1) de *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV)**

A comparação dos *contigs* com sequências virais identificou uma sequência semelhante ao CABYV. A montagem do genoma deste vírus com o programa Geneious gerou um *contig* correspondente a quase todo o genoma do CABYV, mas apresentando uma região divergente dentro do genoma, sugerindo a montagem de um genoma quimérico artificial pelo *software* Geneious no momento da montagem do genoma.

Desta forma, *primers* complementares à região anterior (ou a montante) e posterior (ou

juzante) da possível parte da sequência com divergência foram desenhados (**Tab. 1**, primers Polero\_2769\_For: AACGCCCTCGGAATTGATCACC e Polero\_3834\_Rev: TTGCTGAATACAAATGCTTGCATC) para amplificar por RT-PCR essa possível região quimérica, com tamanho estimado de 579 pb. Para isso, o RNA total de amostras individuais de meloeiro apresentando sintomas de clorose foi extraído utilizando o kit *Plant RNA Reagent* (Thermo Fisher, Invitrogen). Em seguida o cDNA foi sintetizado pela transcriptase reversa M-MLV. A reação consistiu de 10 µL de RNA total (ca. 2 µg/ µL), 1 µL de *primer* randômico (10 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM) e incubada por 75° por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 4 µL do tampão (5X), 2 µL de DTT (0,1M), 1 µL de M-MLV (Thermo Fisher, Invitrogen) e 1 µL de RNaseOUT (40 U/µL, Thermo Fisher, Invitrogen). A reação final foi incubada por 1 hora a 37° C e posteriormente a 75° C por 15 minutos para inativação da enzima. Em seguida, o DNA específico foi amplificado por PCR utilizando os *primers* Polero\_2769\_For (AACGCCCTCGGAATTGATCACC) e Polero\_3834\_Rev (TTGCTGAATACAAATGCTTGCATC) com a enzima *Taq* DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil), seguindo as instruções do fabricante, com uma temperatura de anelamento de 51° C. O DNA amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1%.

Dois isolados coletados em 2016, M3 (Icapuí, CE) e JMB1 (Mandacaru, Juazeiro, BA) foram selecionados aleatoriamente para a determinação da sequência completa do genoma usando o método de Sanger. O genoma completo dos dois isolados foi amplificado em quatro partes: extremidade 5', região 5', região 3' e extremidade 3'. Os quatro fragmentos foram amplificados com os *primers* descritos na Tabela 1. As regiões internas do genoma foram amplificados por RT-PCR. As extremidades 5' e 3' foram obtidos pela metodologia *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) e a obtenção dessas duas regiões está descrita a seguir.

**Tabela 1.** Sequências dos *primers* usados para amplificação do cDNA do genoma do CABYV por RT-PCR e pelo protocolo RACE.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
5' RACE	
GSP 1	GTT CCA CGA ATA TAT TGC TGC TT
GSP 2	AGC TCT AGA GTA ATG TCG CGC G
Região 5'	
603F	AAG CAG CAA TAT ATT CGT GGA AC
3834R	TTG CTG AAT ACA AAT GCT TGC ATC
Região 3'	
2769F	AAC GCC TTC GGA ATT GAT CAC C
5389R	ACC CCA GGT GTG TTT TGA TAT AC
3' RACE	
5123F	AAT GTA CCG GAT GAA TTT GTT CC
M4	TCA GCA CTG ACC CTT TTG

Para amplificar as regiões 5' e 3' do genoma, primeiramente o RNA total foi extraído das amostras foliares usando o kit ZR Plant RNA MiniPrep (Zymo Research). O cDNA foi sintetizado usando a enzima transcriptase reversa Superscript IV (Thermo Fisher Scientific) com o iniciador reverso Polero\_5596\_Rev (ATACATAGTTCGCTCGGCAGTG), em duas reações. A primeira reação com 10 µL de RNA total (2 µg/ µL), 1 µL dNTPs (10 mM) e 1 µL do *primer* específico Polero\_5596\_Rev (10 mM). Esta primeira reação foi incubada a 75° por 5 minutos e depois mantida em gelo por 3 minutos. Foi adicionado 4 µL do tampão da enzima 5x First-Strand, 2 µL de DTT (0,1M), 1 µL da enzima SuperScript IV transcriptase reversa (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de RNaseOUT (40 U/ µL) e incubado por 1 hora a 52°C. Por fim, após a inativação da enzima a 75° C por 15 minutos, o cDNA foi tratado com 1 µL RNase H (5 U/µL, Thermo Fisher Scientific) e 0,1 µL RNase A (10 mg/mL, Thermo Fisher Scientific) a 37° C por 30 minutos.

A amplificação por PCR foi realizada com *primers* desenhados com base na sequência

consensus obtida por NGS. Os *primers* 603F/3834R e 2789F/5389R (Tab.1) amplificam as regiões 5' e 3', respectivamente, do genoma em dois fragmentos de aproximadamente 3,2 e 1,9 kbp, que formam sobreposição de ~300 pb. A reação de PCR continha 5 µL 5X LongAmp *Taq* Reaction Buffer, 1 µL de dNTPs (10mM), 1 µL de cada *primer* 603F/3834R (1 mM, região 5') e 3536F/5389R (10 mM, região 3'), 1 µL de LongAmp *Taq* DNA Polymerase (500 U, New England Biolabs) e 1 µL do cDNA obtido com o *primer* específico 5596Rev. A reação foi incubada a partir de uma temperatura de *hotstart* manual de 80° C por 1 min., seguida por uma pré-desnaturação a 94° C por 2 min. e mantida por 35 ciclos sob uma temperatura de desnaturação de 94° C por 15 segundos, de anelamento de 55° C por 1 min. e de extensão a 65° C por 3 min., seguida por incubação a 65° C por 10 min. Os amplicons de tamanho esperado foram observados em gel de agarose e, em seguida, foram purificados do gel utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences). O cDNA purificado foi sequenciado pelo método Sanger pela empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul).

#### **2.2.4.2. Determinação da sequência da extremidade 5' do genoma do isolado M3 e JMB1 de CABYV por 5'RACE**

Para obtenção da sequência da extremidade 5' do genoma dos isolados M3 e JMB1 do CABYV, foi empregada a metodologia *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE), conforme as instruções do fabricante. Este método consiste em amplificar por RT-PCR a extremidade 5' desconhecida do RNA a partir de fragmentos internos de sequência conhecida. São utilizados três primers específicos reversos complementares à região 5' do genoma, denominados GSP1 (mais externo), GSP2 (interno entre GSP1 e GSP3) e GSP3 (mais interno, ainda próximo à extremidade 5') (Tab. 1). Uma sequência homopolimérica de citosina (citidina) é adicionada na extremidade 3' na fita complementar após a transcrição reversa com o *primer* GSP3 utilizando a enzima Terminal Desoxinucleotídeo Transferase (TdT).

Inicialmente, o RNA total foi extraído a partir de amostras foliares sintomáticas utilizando o kit ZR Plant RNA MiniPrep™ (Zymo Research, Irvine, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para a obtenção do cDNA, 10 µL do RNA total foi incubado juntamente com 1 µL de dNTPs (10 mM) e 1 µL GSP3 (10 µM) a 75° C por 5 minutos para desnaturação. Após, foi mantido no gelo e colocado 4 µL do tampão da enzima 5x First-Strand, 2 µL de DTT (0.1M), 1 µL da enzima SuperSript IV (200 U/ µL), 1 µL de RNase Out (40 U/ µL) e incubado por 1 hora a 52°C. Por fim, após a inativação da enzima a 75°C por 15 minutos, o cDNA foi tratado com 1 µL RNase H (5 U/µL, Thermo Fisher Scientific) e 0,1 µL RNase A (10 mg/mL, Thermo Fisher Scientific) a 37° por 30 minutos.

O cDNA foi então purificado utilizando o Kit “GFX PCR DNA e Gel Band Purification” (GE Healthcare) antes da síntese da sequência poli C. Para sintetizar a sequência homopolimérica de desoxicitidina (dCTP), foi feita uma reação processada em duas etapas: 1ª etapa: foi preparada uma reação contendo 2 µL de 10x TdT Reaction Buffer, 2 µL de CoCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 0,5 µL de dCTP (5mM), incubada a 94° C por 2 min e colocada no gelo em seguida; na 2ª etapa foi adicionada a enzima TdT (20 U/µL, New England Biolabs) e a reação foi incubada a 37° C durante 1h e seguida por mais 10 min a 70° C para inativar a enzima. Esta reação foi utilizada nas PCRs seguintes utilizando a enzima LongAmp *Taq* DNA polimerase (500 U, Neb BioLabs). São realizadas duas PCRs. A primeira PCR é realizada com o *primer* específico reverso GSP2 e um *primer* complementar à região poli(C) adicionada contendo uma sequência âncora que vai ser utilizada na próxima PCR (Anchor *primer*5'- AAA CCA CGA CAC CTC CAA GCA AGG GGI IGG GII GGG IIG -3'). Na segunda PCR são utilizados os *primers* GSP1 e o *primer Nested* complementar (5'-ACC ACG ACA CCT CCA AGC AAG-3') a sequência âncora adicionada anteriormente.

Os fragmentos de DNA amplificados de cerca de 500 nucleotídeos foram visualizados em gel de agarose a 1%, eluídos e a sequência de nucleotídeos determinada pela empresa

Macrogen (Coréia) por sequenciamento automático.

#### **2.2.4.3. Determinação da sequência da extremidade 3' do genoma do isolado M3 e JMB1 de CABYV por 3'RACE**

O método 3' RACE consiste na identificação da sequência da extremidade 3' do genoma de um RNA mensageiro ou viral a partir do conhecimento da sequência de um segmento interno deste genoma, que apresenta uma cauda poli(A) ), se não houver, adicionando cauda de poli(A) com poly(A) polymerase.

Então, para identificação da sequência da extremidade 3' do genoma do CABYV, folhas de meloeiro com sintomas de amarelão dos isolados M3 e JMB1 foram submetidas a extração de RNA total com o kit ZR Plant RNA MiniPrep™, seguindo instruções do fabricante. Como o CABYV não possui cauda poli(A) na extremidade 3' foi necessário adicioná-la com a enzima *Escherichia coli* Poly(A) Polymerase. Esta reação foi feita com 5 µL de RNA (2 µg/µL), 1 µL de 10X *E. coli* Poly(A) Polymerase Reaction Buffer, 2 µL de ATP (10mM), 1 µL de *E. coli* Poly(A) Polymerase (NEB, New England Biolabs) e 2,5 µL de água Milli-Q autoclavada RNase free. Para poliadenilação, esta reação foi incubada a 37° C por 30 min., seguido de incubação a 65° C por 20 min. para inativação da enzima.

Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA poliadenilado utilizando a transcriptase reversa SuperScript IV. A reação consistiu de 10 µL (2 µg) de RNA total, 1 µL de *primer* reverso OligodT<sub>50</sub>PacI-M4 (50 µM) (5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACT TAA TTA ATT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3') e 1 µL de dNTPs (10 mM), seguida por incubação de 5 minutos a 75° C. Foi adicionado no microtubo, 4 µL do tampão 5x First-Strand, 2 µL de DTT (0,1M), 1 µL de RNase Out (40 U/ µL, Thermo Fisher Scientific) e 1 µL da enzima Super Script IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). A reação foi incubada a 52°C por 1 hora e 75°C por 15 minutos, para inativação da enzima. Por fim, o cDNA foi tratado com 1 µL RNase H (5 U/µL, Thermo Fisher

Scientific) e 0,1 µL RNase A (10 mg/mL, Thermo Fisher Scientific) por 30 min. a 37°C.

Para amplificar o fragmento correspondente à extremidade 3', foi preparada uma PCR com a enzima Long Amp *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs). A reação consistiu de 15 µL de H<sub>2</sub>O, 5 µL do tampão da enzima, 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL do *primer* reverso M4 (10 mM) (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'), 1 µL do *primer forward* 5123F (10 mM) (**Tab. 1**), 1 µL da enzima e 1 µL do cDNA. A temperatura de anelamento dos *primers* foi de 55°C por 1 minuto. Os amplicons gerados foram visualizados em gel de agarose a 1%, eluídos e a sequência determinada por sequenciamento automático pela empresa Macrogen (Coreia).

#### **2.2.4.4. Análise filogenética e de recombinação das sequências genômicas dos isolados M3 e JMB1 de CABYV**

As sequências do genoma foram inicialmente analisadas pelas buscas tBlastX realizada pelo programa Geneious R8.1 (Kearse *et al.*, 2012) para identificar os vírus mais próximos. EMBOSS Needle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) foi utilizado para o alinhamento *pairwise* das duas sequências do genoma.

Uma árvore filogenética foi construída após o alinhamento múltiplo por Clustal dos variantes brasileiros de CABYV (M3 e JMB1) com outros polerovírus mais relacionados, utilizando método da máxima verossimilhança com o modelo Kimura de 2 parâmetros para sequências completas do genoma e com o modelo Jones-Taylor-Thornton para sequências de proteínas maiores e menores usando MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Foi feita identificação e caracterização dos possíveis eventos de recombinação utilizando o Programa de Detecção de Recombinação versão 4 (RDP4) (Martin *et al.*, 2015) com sequências completas do genoma de polerovírus que infectam plantas de cucurbitáceas e outros polerovírus. Nesta análise, foram considerados significativos os eventos de recombinação com *p values* < 1,0 × 10<sup>-10</sup>.

As sequências de nucleotídeos do gene P0 de 37 isolados de CABYV foram obtidas de bancos de dados públicos de DNA para a análise espaço-temporal. O ano e a localização da coleta de cada isolado foram obtidos a partir de registro em artigos publicados ou nos bancos de dados de DNA. As sequências foram analisadas com TemPest (Rambaut *et al.*, 2016) para identificar o sinal temporal nos dados para, então, proceder a análise com o relógio molecular (BEAST v1.8.4, Tracer v1.6) (Drummond *et al.*, 2012) e análise filogeográfica (SPREAD, Bielejec *et al.*, 2011). As sequências foram alinhadas usando MUSCLE (em Geneious R8.1). As taxas estimadas de substituição de nucleotídeos por local, o tempo para o antepassado comum mais recente e as substituições estimadas de aminoácidos foram calculadas utilizando BEAST v1.8.4. Os seguintes conjuntos de dados foram utilizados para criar o arquivo XML a ser executado em BEAST: modelo de substituição de aminoácidos (Blosum 62); modelo de heterogeneidade do site (Gamma plus Invariant Sites, Categoria 4), modelo de substituição de característica discreta com a variável de pesquisa estocástica bayesiana (BSSVS), tipo de relógio para localização (Strict), alinhamento de aminoácidos do tipo “clock” (Relógio descontrolado relaxado) e modelo de árvore (Coalescente: crescimento exponencial). JModelTest v3.7 (Posada, 2008) foi usado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos de melhor ajuste para o alinhamento: HKY com G + I. Todas as outras configurações foram às mesmas descritas acima. O programa BEAST foi executado até alcançar convergência. O comprimento da cadeia foi de 20 milhões, sendo que 10% dos métodos de Monte Carlo da cadeia Markov foram descartados como queimados. A evidência estatística foi representada pelos valores de HDP de 95%. Todos os valores de tamanho de amostra efetivos dos parâmetros foram >300. FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) foi usado para visualizar e editar a árvore de máxima credibilidade. Uma possível migração espaço-temporal do CABYV brasileiro em todo o mundo foi convertida em animação em vídeo.

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. Obtenção da sequência do genoma completo do isolado de CABYV via plataforma Illumina.**

Como será discutido no capítulo 4, o resultado do NGS demonstrou também alta frequência de sequências homólogas ao carlavírus Melon yellowing-associated virus. A análise de NGS detectou o Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) como o principal vírus nas bibliotecas que foram obtidas. Duas sequências de genoma foram montadas usando os dados de NGS: a primeira sequência, denominada CABYV-Mossoró, foi oriunda de um sequenciamento a partir de 22 amostras de melão coletadas em 2015 perto de Mossoró. A sequência foi montada a partir de 1 276 525 *reads*. A segunda sequência denominada CABYV-Juazeiro foi obtida a partir de seis amostras de melão também coletadas em 2015 em Juazeiro, em que foram obtidos 4 434 827 *reads* com correspondência a este vírus.

As sequências-consenso dos isolados M3 e JMB1 obtidas a partir do NGS apresentam ~ 5700 nucleotídeos de comprimento e compartilham entre si 96,8% de identidade de nucleotídeos, o que os colocam como isolados diferentes. Os dois isolados compartilham 76,3% de identidade com CABYV-N da França (número de acesso X76931). A identidade com o CABYV-N sugeriu que uma variante de CABYV estava presente em plantas meloeiro em Mossoró e Juazeiro. Curiosamente, as sequências brasileiras de CABYV foram únicas na região 3' do genoma, sem identidade aparente com sequências de outros isolados de CABYV, possivelmente sugerindo uma origem recombinante para essa região 3'.

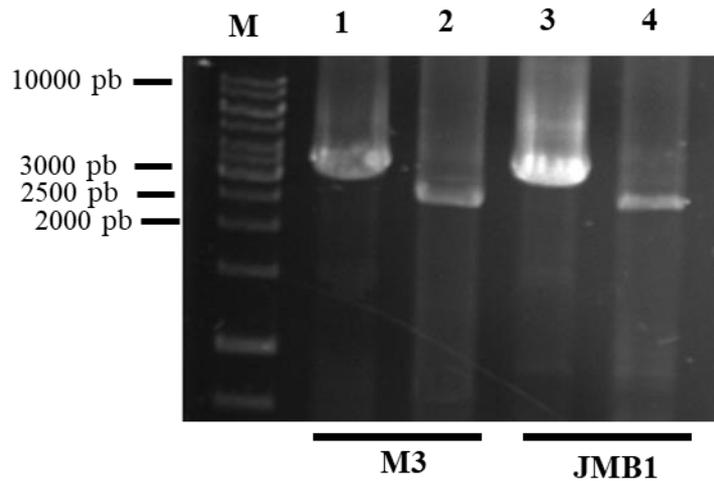
### **2.3.2. Validação do genoma completo dos isolados M3 e JMB1 de CABYV via Sequenciamento automático convencional (Sanger).**

Para descartar a possibilidade da montagem artificial de genoma quimérico, foi desenhado um par de *primers* (Polero\_2769\_For / Polero\_3834\_Rev) que amplifica a região anterior ao ponto da recombinação do genoma de CABYV e dentro da sequência

recombinante (sem identidade ao CABYV). O RT-PCR foi realizado com o RNA total do *pool* de amostras coletadas em Mossoró enviado para NGS. Foi amplificado um fragmento de cDNA de tamanho esperado de ~1065 nt, demonstrando a existência de uma região recombinante no RNA genômico de CABYV e descartando a hipótese de recombinação quimérica artificial.

Este par de iniciadores (2769For/3834Rev) foi então utilizado para detectar por RT-PCR o CABYV em amostras de meloeiro coletadas em 2015 e 2016 perto de Mossoró e Juazeiro. Ao todo, foram avaliadas 52 amostras de meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão” coletadas em Juazeiro e Mossoró. Destas 52 amostras, 31 amostras foram positivas, sendo 21 do total de 29 (21/29) de Mossoró e 10/23 de Juazeiro, indicando uma alta prevalência desse vírus recombinante nessas duas regiões. Duas amostras de plantas coletadas em 2016 foram selecionadas para confirmar a sequência montada com *reads* provenientes do NGS via sequenciamento do genoma completo pelo método automático convencional (Sanger). Essas amostras foram identificadas como M3 (perto de Mossoró, RN) e JMB1 (Juazeiro, BA), denominadas então CABYV-M3 e CABYV-JMB1, respectivamente.

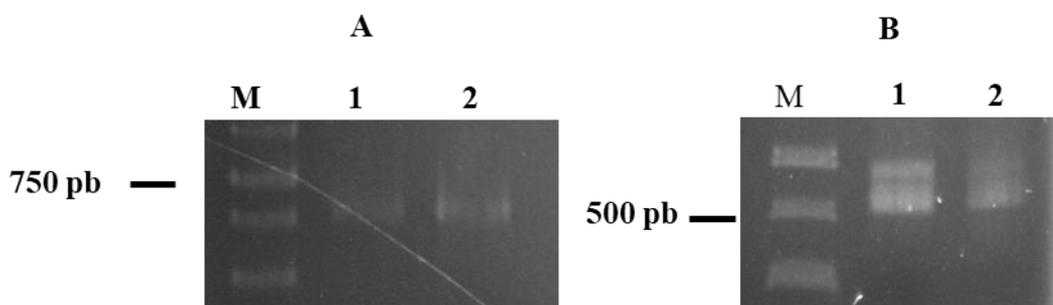
Para sequenciar o genoma completo, quatro regiões genômicas foram amplificadas: as extremidades 5' e 3' e as internas da porção 5' e da porção 3' dos isolados CABYV-M3 e CABYV-JMB1. Para a região interna 5' foram utilizados os *primers* (603F/3834R, Tab. 1) com amplicon de ~3231 nt (Fig. 2). Para amplificar a porção interna 3' foram utilizados os *primers* (2769F/5389R, Tab. 1) gerando um fragmento de DNA de 2620nt (Fig. 2). Todos os fragmentos produzidos apresentam sobreposição entre eles. A sequência de nucleotídeos foi determinada por sequenciamento automático direto do produto de PCR.



**Figura 2.** Gel de eletroforese dos produtos obtidos pela amplificação por RT-PCR com *primers* internos ao genoma de CABYV a partir de RNA total extraído de meloeiro apresentando sintoma de “Amarelão”. Amplificação da porção interna 5' de ~3,2 kb (1) e 3' de ~2,6 kb (2) do genoma do isolado M3 e da porção 5' (3) e 3' (4) do genoma do isolado JMB1. M: marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Para o isolamento da região terminal 5'UTR do genoma dos isolados CABYV-M3 e CABYV-JMB1, *primers* antisense foram sintetizados. Pela técnica de 5' RACE, foi possível amplificar um fragmento final com tamanho de 750 pb (Fig. 3A) para os dois isolados, e sequência determinada via sequenciamento Sanger.

Para a confirmação da região 3'UTR dos isolados CABYV-M3 e CABYV-JMB1, foi utilizado o par de *primers* M4 (reverso) e 5123F, sendo possível observar a amplificação de um fragmento de 603 pb, como demonstrado na figura 3B.



**Figura 3.** Gel de eletroforese dos produtos obtidos pela amplificação por RT-PCR . **A.** Amplicons de ca. de 750 pb da extremidade 5' obtidos pela técnica 5 RACE e **B** amplicons de ca. De 603 pb referentes a extremidade 3' obtidos por 3 RACE. Os poços 1 e 2 correspondem aos isolados M3 e

JMB1 de CABYV, respectivamente, nas figuras A e B. M: marcador molecular GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

As sequências do genoma das variantes brasileiras de CABYV foram depositadas no banco de dados de DNA com os números de acesso LC217993 (CABYV-M3) e LC217994 (CABYV-JMB1). As sequências do genoma completo dos isolados M3 e JMB1 foram de 5736 e 5737 nucleotídeos (nt), respectivamente; o isolado JMB1 continha um *indel* de um nt na 3' UTR. As sequências completas do genoma desses dois isolados diferiram em 181 nt, distribuídos principalmente na região 5' do genoma.

### **2.3.3. Organização genômica dos isolados M3 e JMB1 de CABYV**

Uma organização típica do genoma de poliovírus foi predita para ambas as sequências do genoma, incluindo a proteína de fusão P3-P5 com ribossomal frameshift (Brault *et al.*, 2005). Foram identificados cinco ORFs: ORF 0 (P0, nt 21-737), ORF 1 (P1, nt 142-2034), ORF 2 (P2, nt 1977-3308), ORF 3a (nt 3390-3527 com codon de iniciação de AUA), ORF 3 (P3, nt 3508-4125), ORF 4 (P4, nt 3527-4072) e ORF 5 (P5) com *ribosomal readthrough* de 4,126 a 5556 nt, adjacente a ORF 3 (Fig. 8A). As massas das proteínas previstas foram semelhantes às de CABYV-N (da França): 27,4 kDa para P0, 68,7 kDa para P1, 50,2 kDa para P2, 5 kDa para P3a, 22,4 kDa para P3, 20,2 kDa para P4 e 75,4 kDa para a proteína de fusão P3-P5. A slippery heptamer, GGGAAAC, foi identificado em nt 1482-1488, resultando a proteína fusão de P1-P2 (118,7 kDa) pelo *frameshift*.

A primeira ORF (ORF 0) codifica a proteína P0 relatada como supressora de silenciamento gênico pós-transcricional (Csorba *et al.*, 2010). A ORF 1 (P1), que se sobrepõe a ORF2, contém uma sequência conservada de serina peptidase tipo 3C (aa 202-402), que é conservada em todas as sequências de aminoácidos ORF1 de poliovírus (Huang *et al.*, 2005). Uma sequência heptamérica, GGGAAAC, foi encontrada na posição 1482 nt na região C-

terminal da proteína P1, como no primeiro genoma de CABYV relatado por Guilley *et al.* (1994). Esta sequência heptamérica possivelmente deslizante pode causar um deslocamento de quadro, produzindo a proteína de fusão P1-P2 (118,7 kDa). Os isolados brasileiros também apresentaram outras características comuns de CABYV anteriormente descritas (Guilley *et al.*, 1994) na região 5' do gene P2.

O final do gene da capa proteína (CP ou P3) (AAAUAGGUAGAC, codon de parada sublinhado) contém a sequência UAG de “escorregamento” ("leaky") conservado nos poliovírus. Por outro lado, o motivo conservado na CP de poliovírus G(IM)LK(AS)YHE (Guilley *et al.*, 1994) é diferente nos isolados brasileiros, sendo GLLAAFHQ.

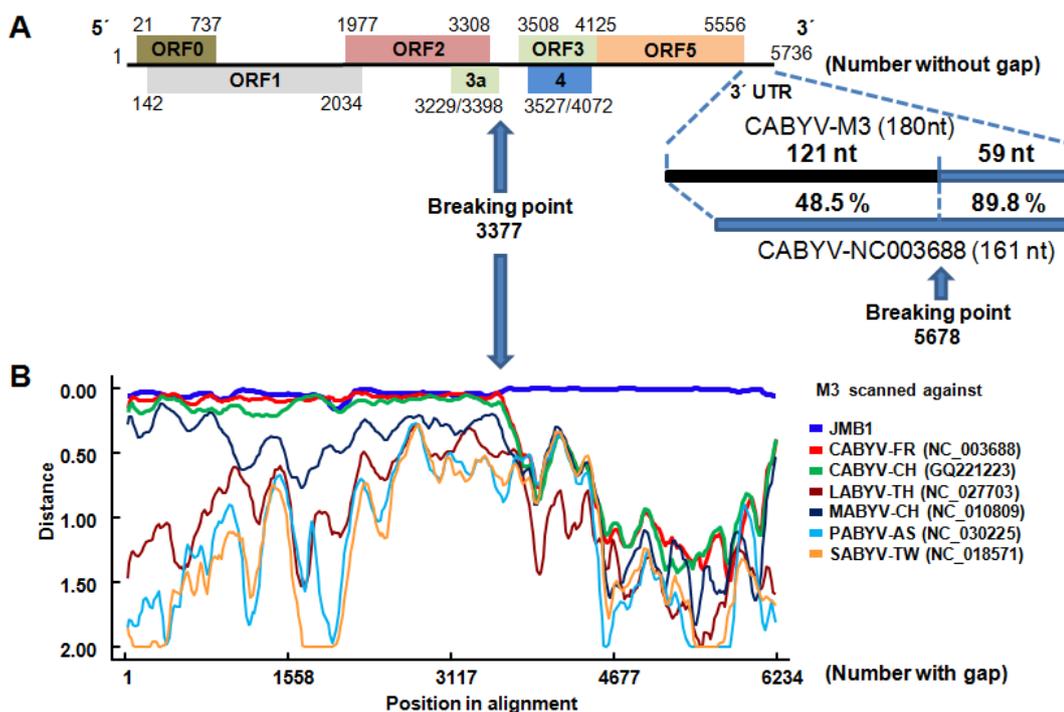
Foi observada também uma diferença no domínio conservado da Prolina, presente no início do domínio de leitura da proteína do capsídeo menor (P5). De modo geral, em poliovírus esse domínio da Prolina consiste da sequência PPPSPSPTPPPPPPP (Guilley *et al.*, 1994), enquanto nos isolados brasileiros foi observado o domínio PPIPPPPPP. Este domínio é conservado no terminal carboxílico da P5 dos vírus CABYV, beet western yellows virus e potato leafroll virus e corresponde a uma região determinante potencial para as espécies de vetores (Guilley *et al.*, 1994), porém foi completamente diferente nos isolados brasileiros de CABYV.

#### **2.3.4. Análise de recombinação dos isolados M3 e JMB1 de CABYV**

As análises de recombinação sugeriram que os isolados M3 e JMB1 são recombinantes tendo o isolado CABYV-N (número de acesso X76931) como o parental principal (“*major parent*”) com o ponto de recombinação inicial na posição 3376 nt na ORF3a, próximo a região intergênica (IR), e ponto de quebra final na posição 5678 nt na 3' UTR (*p*-valor  $3.614 \times 10^{-97}$  por RDP4) (Fig. 5A e B).

O parental menor (“*minor parent*”) não foi identificado. A identidade relativamente

baixa com um vírus desconhecido sugere que o domínio de leitura da CP menor (P5) pode ser parte de outra sequência recombinante (recombinação dupla, como indicado por RDP4, Fig. 5B). Os sítios de recombinação putativos encontram-se no final da ORF2 e na 3' UTR, representando ~ 40% do genoma. Devido a esta recombinação, o isolado M3 apresentou uma 3' UTR mais longa, contendo 180 nt em comparação com o isolado francês CABYV-N, que possui com 161. Os últimos 59 nt eram de origem comum, compartilhando 89,8% de identidade nt (Fig. 5A). A primeira parte do genoma de M3 (1-3376 nt, posição na sequência M3) apresenta 93,6% de identidade com CABYV-N, enquanto que a segunda parte (3377-4897 nt) tinha 50,3%, a terceira parte (4898-5677 nt) teve 40,8%, e a última parte (5678-5736 nt) apresentou 89,9% (Fig. 5B). A baixa identidade na segunda e terceira parte do genoma do isolado M3 indica que ocorreu uma recombinação putativa entre o CABYV e um poliovírus desconhecido.



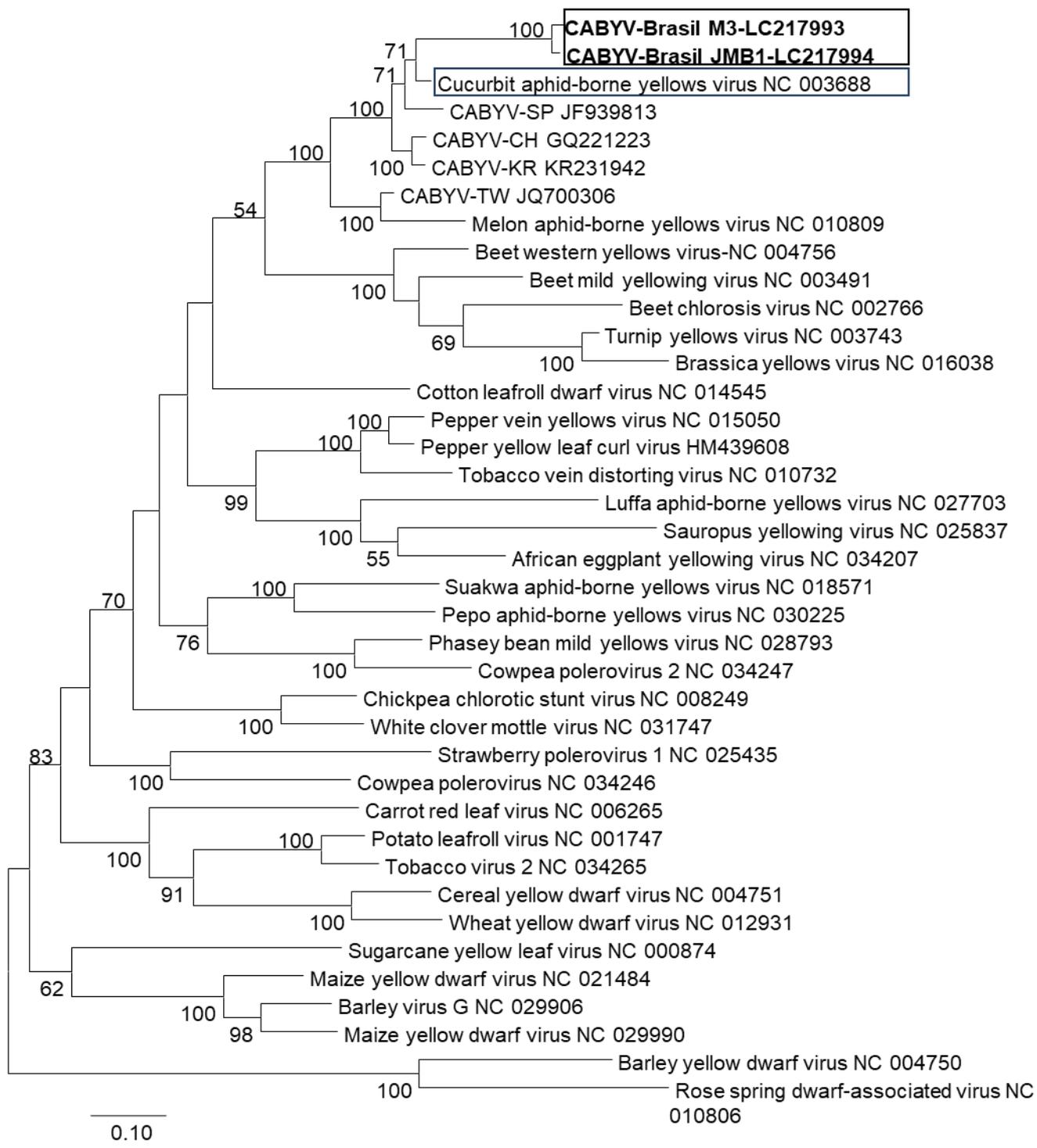
**Figura 5. A.** Organização do genoma do CABYV brasileiro de cerca de 5,7 Kbases. Genoma dividido em sete ORFs: ORF0, ORF1, ORF2, ORF3, ORF3a, ORF4 e ORF5. **B.** Gráfico da análise de recombinação utilizando o programa RDP4. A seta azul apontando para o genoma e para o gráfico de recombinação indica o ponto do início da recombinação (*breaking point* 3377). O gráfico no eixo y exibe a distância calculada pelo programa RDP4 e o eixo x exibe a posição do alinhamento do genoma do isolado M3 de CABYV comparando com as espécies de polerovírus cucurbit aphid-borne yellows virus da França e China (CABYV-FR, CABYV-CH), luffa aphid-borne yellows virus da Tailândia (LABYV-TH), melon aphid-borne yellows virus da China (MABYV-CH), pepo aphid-borne yellows virus dos EUA (PABYV-AS) e suakwa aphid-borne yellows virus de Taiwan (SABYV-TW). A região 3' UTR maximizada no canto superior direito do genoma demonstra o fim de evento de recombinação com o isolado CABYV-FR.

### 2.3.5. Análise filogenética do isolado M3 e JMB1 de CABYV

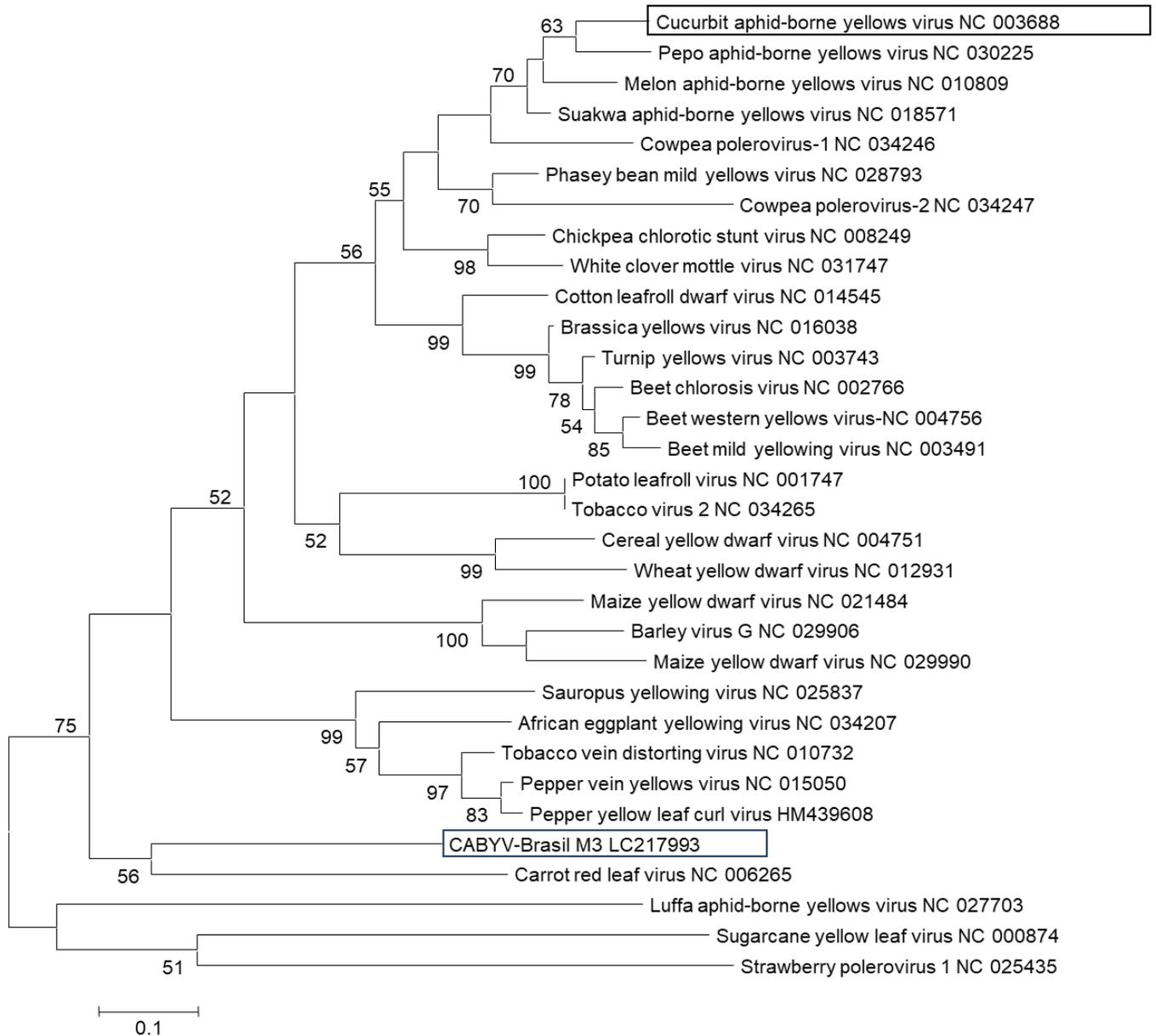
Foi feita análise filogenética entre o genoma dos dois isolados brasileiros de CABYV (M3 e JMB1), cinco sequências de CABYV de outros países e outras 32 sequências de polerovírus disponíveis no banco de dados. Todas as sequências de CABYV agruparam com o melon aphid-borne yellows virus (MABYV) (Fig. 6), que foi descrito na China. As sequências brasileiras de CABYV se agruparam, mas foram claramente separadas de outras sequências de CABYV. Um isolado Taiwan de CABYV também foi separado do cluster principal de CABYV devido à recombinação com MABYV, como relatado anteriormente (Knierim *et al.*, 2010). O isolado de CABYV brasileiro está mais relacionado com um isolado

francês (isolado N, número de acesso X76931) coletado em 1989 (Lecoq *et al.*, 1992, Guilley *et al.*, 1994), com 73,7% de identidade de nucleotídeos (Emboss Needle). O perfil de identidade utilizando o Clustal Omega (EMBL-EBI) mostrou que o genoma do CABYV-M3 compartilhou identidade de nucleotídeos com outros polerovírus que infectam cucurbitáceas de 62,2% com MABYV (EU000534), 51,1% com o pepo aphid-borne yellows virus (PABYV) (KU315178), 51,4% com o suakwa aphid-borne yellows virus (SABYV) (JQ700308) e 52,3% com o luffa aphid-borne yellows virus (LABYV) (KF427701).

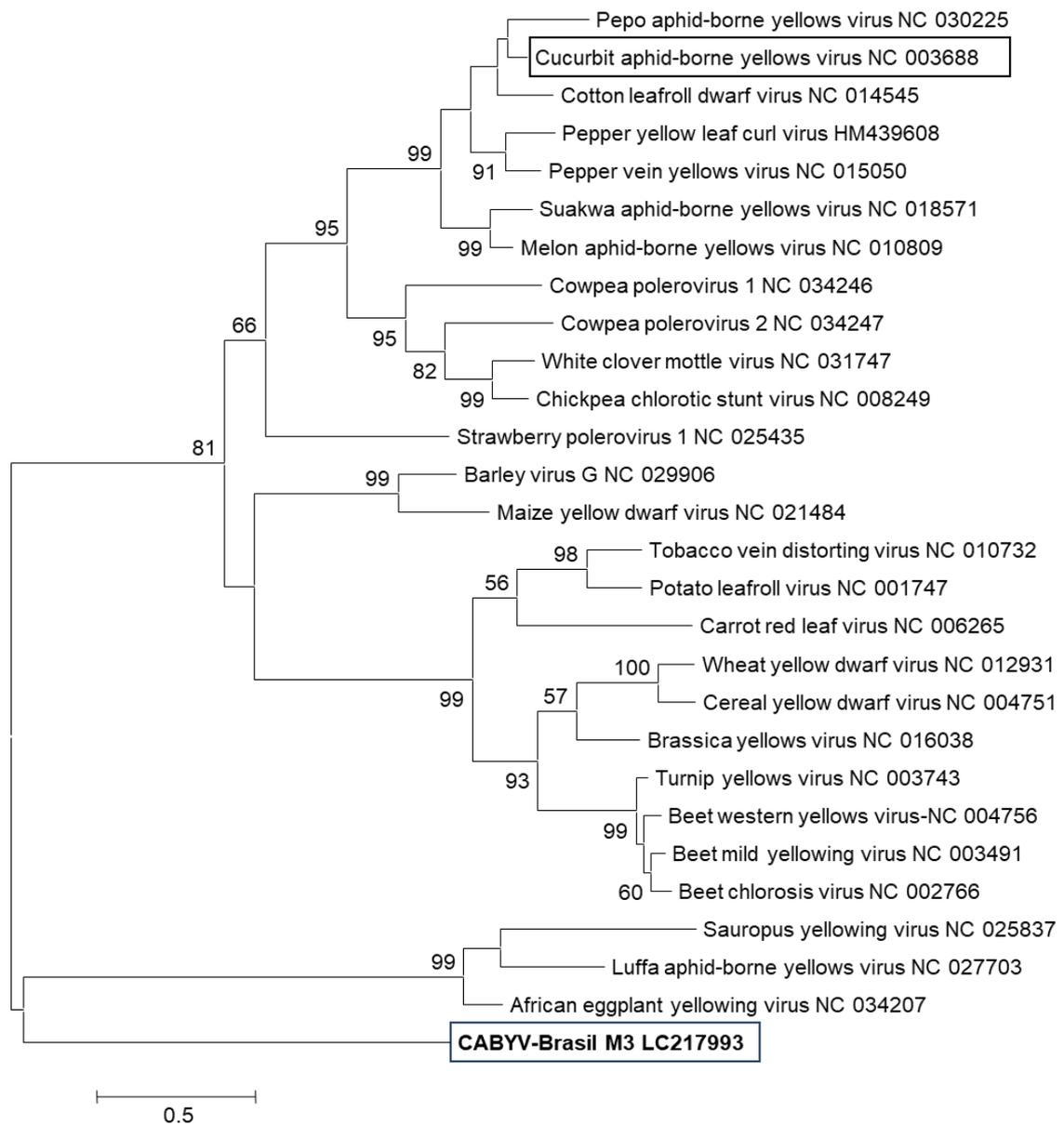
Nas análises filogenéticas utilizou-se somente a sequência do isolado CABYV-M3, pois se observou o mesmo resultado para o isolado CABYV-JMB1, sem diferença significativa, por possuírem pouca diferença na sequência do genoma. A posição do isolado brasileiro CABYV-M3 na árvore filogenética foi completamente diferente quando as sequências de aminoácidos P3, P4 e P5 foram analisadas separadamente (Fig. 6, 7 e Fig. suplementar 2). A sequência de proteína P3 de CABYV-M3 agrupou-se com o carrot red leaf virus (NC 006265) e estava distantemente relacionada com outros polerovírus que infectam cucurbitáceas (Fig. 6). Da mesma forma, as sequências da proteína P5 (Fig. 7) e P4 (Fig. suplementar. 2) do isolado M3 não se agruparam com CABYV ou com os outros polerovírus de cucurbitáceas. Esses resultados sugeriram fortemente que os isolados brasileiros de CABYV são recombinantes entre CABYV e provavelmente um outro polerovírus ainda não identificado.



**Figura 6.** Árvore filogenética composta por sequências genômicas completas em nucleotídeo de todos os isolados de cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) brasileiros (negrito) e disponíveis. A sequência-referência de CABYV está destacada. A análise incluiu sequências-referência dos polerovírus mais próximos. Como outgroup foram utilizados os luteovírus barley yellow dwarf virus e rose spring dwarf-associated virus.



**Figura 7.** Árvore filogenética composta por sequências completas em nucleotídeo da ORF3 de diferentes espécies de *Polerovirus* com os seus respectivos número de acesso. Como outgroup foram utilizadas os luteovírus barley yellow dwarf virus e rose spring dwarf-associated virus.

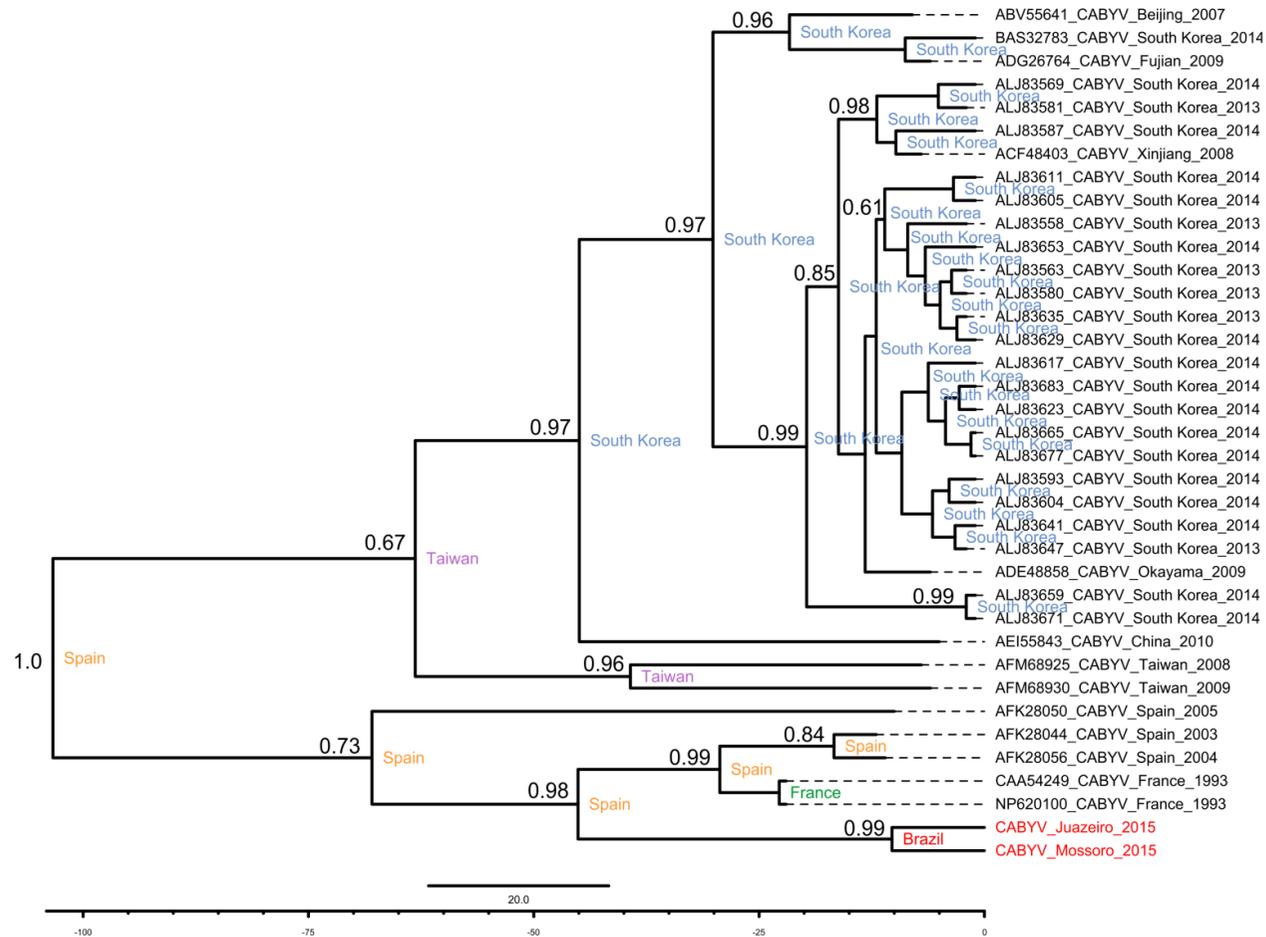


**Figura 8.** Árvore filogenética composta por sequências completas em nucleotídeo da ORF5 de diferentes espécies de *Polerovirus* com os seus respectivos número de acesso. Como outgroup foram utilizadas os luteovírus barley yellow dwarf virus e rose spring dwarf-associated virus.

### 2.3.6. Análise de relógio molecular do CABYV brasileiro

Para o estudo evolutivo, selecionou-se o gene da P0 de CABYV para evitar a inclusão de sequências potencialmente recombinantes, notadamente as regiões que compreendem o final da P2 (RdRp) e o início dos gene da P3 (CP) onde a ocorrência de recombinação em polerovírus é normalmente relatada. A região recombinante do CABYV brasileiro inicia no gene da P2 e finaliza na 3' UTR. O gene P0 de 37 isolados de CABYV da França, Espanha, Japão, Taiwan, Coréia do Sul e China foi obtido de bancos de dados públicos de DNA. A correlação entre a divergência de raiz para ponta e o tempo de amostragem inferido pelo TemPest para o conjunto de dados de nucleotídeos gerou um  $r^2$  de 0,30, um coeficiente de correlação de 0,55 e uma média residual de  $r^2$  de  $1,13E^{-3}$ , indicando um sinal detectável de divergência de sequência durante o tempo de amostragem. A análise de BEAST mostrou que as taxas médias evolutivas para aminoácidos variaram de  $3,81E^{-3}$  a  $4,54E^{-4}$  substituições / site / ano (média =  $2,081E^{-3}$ ), dentro da mesma faixa de nucleotídeos ( $2,59E^{-3}$  a  $2,79E^{-4}$ , significa =  $1,28E^{-3}$ ). Valores semelhantes foram encontrados para o gene da P0 de outros membros da família *Luteoviridae* (Pagán e Holmes, 2010). A árvore máxima de credibilidade de clado da proteína P0 de CABYV identificou dois *clusters* que emergiram ~ 70 anos atrás (Fig. 9). A análise evolutiva indicou que os isolados de CABYV do Brasil provavelmente foram oriundos de uma população viral ancestral da Espanha (localização com probabilidade de 0,6) que surgiu ~ 68 anos atrás. Os isolados CABYV M3 e JMB1 divergiram ~ 10 anos atrás. O baixo número de sequências P0, no entanto, pode ter dificultada a identificação precisa de origens geográficas virais. O aumento a densidade espacial e temporal, a profundidade de amostragem para o gene da P0 de CABYV é, portanto, necessária para melhorar as análises evolutivas. O antepassado comum mais recente proposto para a proteína P0 originou na Espanha a 125,5 (média) anos atrás. Estes resultados estão de acordo com a diversificação proposta em *Luteoviridae* nos últimos 500 anos (Pagán e Holmes, 2010). A reconstrução evolutiva com

difusão espaço-temporal foi visualizada usando SPREAD (animação em vídeo).



**Figura 9.** Árvore de credibilidade de clado máxima utilizando o gene da ORF0 que codifica a proteína P0 do CABYV. Os valores nos nós são as probabilidades calculadas posteriores. O número na escala mostra ano. A barra indica a dispersão temporal dos isolados. Os isolados de Mossoró (M3) e de Juazeiro (JMB1) de CABYV estão destacados em vermelho.

## 2.4. DISCUSSÃO

Este trabalho trata do primeiro relato de CABYV no Brasil em plantas de meloeiro. Os isolados aqui descritos são recombinantes entre o CABYV como parental maior (*major parent*) e um polerovírus desconhecido como o parente menor (*minor parent*). O genoma dos isolados brasileiros de CABYV possui uma organização típica de membros do gênero *Polerovirus*. Análises filogenéticas e do relógio molecular sugeriram que os isolados brasileiros de CABYV são originários de isolados europeus, pelo menos a região 5' do genoma. Os isolados recombinantes de CABYV foram detectados em amostras coletadas perto de Mossoró e Juazeiro, que estão a cerca de 800 Km de distância. Os isolados caracterizados a partir destas duas regiões apresentaram os mesmos locais de junção de recombinação, confirmados por NGS em amostras coletadas em 2015 e por RT-PCR e sequenciamento Sanger em amostras coletadas em 2016. Esta observação implica que a distribuição do isolado CABYV recombinante é generalizada nessas regiões. Este estudo, porém, não detectou o CABYV tipo original. A estimativa do relógio molecular utilizando o gene da P0 sugeriu que esses dois isolados (M3 e JMB1) se separaram do mesmo ancestral há 10 anos, período em que a recombinação já havia ocorrido, porque esses dois isolados possuem a mesma recombinação e alta identidade de nucleotídeo na região do “minor parent” do genoma (região 3'). É necessária uma pesquisa mais global com mais isolados para caracterizar a evolução do CABYV no Brasil.

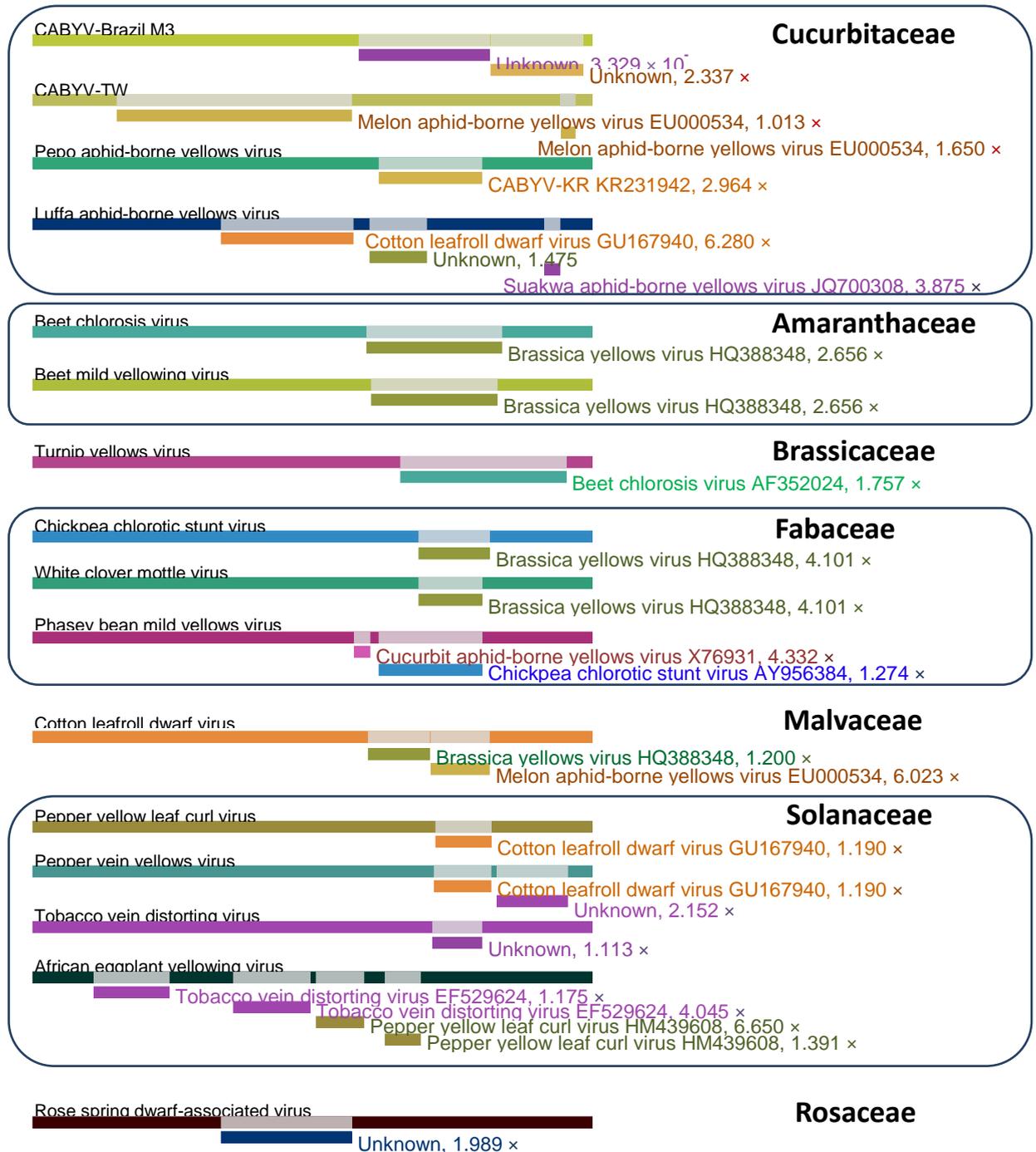
Verifica-se que cinco polerovírus são relatados infectando cucurbitáceas no mundo, CABYV, MABYV, SABYV, PABYV e LABYV. No entanto, nenhum desses vírus já foi relatado no Brasil, sendo assim, esse estudo revelou a presença do primeiro polerovírus em cucurbitáceas no Brasil. O modo de transmissão desses vírus ainda não foi totalmente caracterizado, apesar que se assume que os vírus são transmitidos por pulgões de forma

persistente e não propagativa (Lecoq *et al.*, 1992; Knierim *et al.*, 2010; 2013; 2015; Ibaba *et al.*, 2016) e todos provocam sintomas de amarelecimento nas plantas que infectam. A recombinação interespecífica é comum em polerovírus e alguns exemplos foram descritos em polerovírus que infectam cucurbitáceas. Por exemplo, um recombinante entre CABYV e MABYV na região intergênica (IR) entre ORF2 e ORF3 foi relatado em Taiwan (Knierim *et al.*, 2010). Adicionalmente, recombinações de SABYV com MABYV (Knierim *et al.*, 2013) e PABYV com CABYV (Ibaba *et al.*, 2016), ambas na região intergênica, foram posteriormente relatadas. Especula-se que o LABYV tenha surgido de uma recombinação entre SABYV e o cotton leafroll dwarf-like virus (Fig. Suplementar 1), embora não esteja claramente indicado no relato original (Knierim *et al.*, 2015). Tanto a recombinação inter e intraespecífica já foram relatadas para CABYV (Kassem *et al.*, 2013). O isolado brasileiro de CABYV recombinante é resultante de uma recombinação de CABYV com um polerovírus desconhecido. Os polerovírus geralmente possuem grupos de hospedeiros muito restritos, de modo que a recombinação interespecífica entre os polerovírus que infectam hospedeiros comuns pode alterar a gama de hospedeiro tornando-a mais ampla ou diferente para os vírus recombinantes, com uma vantagem seletiva correspondente (Knierim *et al.*, 2015). As recombinações entre tipos biologicamente diferentes de polerovírus (Fig. Suplementar 1) ocorrem, mas seus ancestrais devem ter sido capazes de infectar uma espécie hospedeira comum para promover a presença de vírus parentes na mesma célula (Kassem *et al.*, 2013). O evento de recombinação provavelmente ocorreu em uma planta, pois os vírus desse grupo não se replicam em seus insetos vetores.

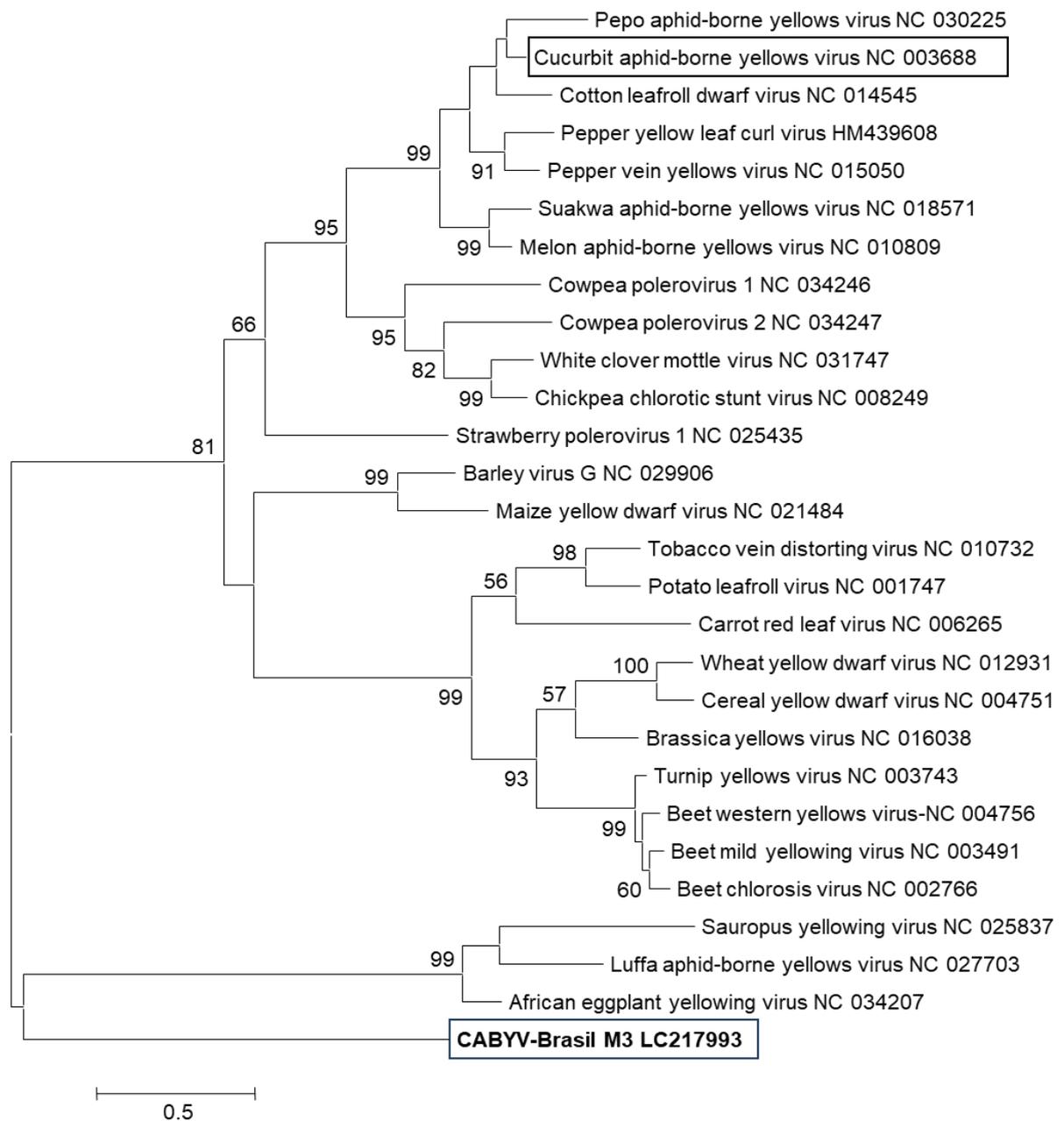
Não é evidente se a recombinação ocorreu antes ou após o ingresso do vírus no Brasil, porque este tipo de recombinação não foi relatado fora do país. Presume-se que o isolado brasileiro de CABYV pode ser o principal agente da doença “Amarelão do meloeiro”, apesar de muitos *reads* correspondentes ao MYaV terem sido detectados na análise de NGS das

amostras (dados não publicados). Apenas 31 de 52 plantas de melão (60%) foram positivas para o CABYV na detecção por RT-PCR com *primers* específicos. Atualmente, está sendo realizado um estudo detalhado da ocorrência de CABYV e outros vírus identificados por NGS em meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão”.

## 2.5. FIGURAS SUPLEMENTARES



**Figura suplementar 1.** Possíveis locais de recombinação previstos por RDP4 em diferentes sequências de espécies polerovírus disponíveis no banco de dados. Os agrupamentos de espécies de polerovírus recombinantes foram baseados na família botânica dos hospedeiros originais.



**Figura Suplementar 2.** Árvore filogenética de polerovírus com base na sequência de aminoácido da proteína P4 (MP, ORF4).

# CAPÍTULO 3

---

---

**CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E TRANSMISSÃO POR  
MOSCAS-BRANCAS (*Bemisia tabaci*) DO ISOLADO BRASILEIRO DE  
*Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV)**

# CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E TRANSMISSÃO POR MOSCAS-BRANCAS (*Bemisia tabaci*) DO ISOLADO BRASILEIRO DE *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV)

## RESUMO

O *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) pertence ao gênero *Polerovirus* (Família *Luteoviridae*). O genoma desse vírus é constituído de RNA fita simples senso positivo e encapsidado em partícula icosaédrica. O primeiro relato de CABYV no Brasil foi realizado por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) (Cap. 2), a partir de amostras de meloeiro apresentando sintomas de amarelão coletadas na região Nordeste. A caracterização molecular desse isolado demonstrou que CABYV brasileiro é um recombinante que tem como *major parent* um isolado de CABYV da França, e, como *minor parent*, um polerovírus desconhecido. Em outros países, o CABYV é relatado sendo transmitido por afídeos de maneira persistente e não propagativa. É observada baixa população de afídeos em meloeiro no Nordeste e tendo em vista a recombinação detectada na região da capa proteica (CP) desse vírus, foi levantada a hipótese do isolado brasileiro de CABYV ser transmitido por moscas-brancas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avançar na caracterização do CABYV, incluindo a produção de antissoro policlonal contra a CP desse vírus, e avaliar se esse isolado de CABYV é transmitido por moscas-brancas. Para isso, foi utilizado o isolado CABYV-M1 para a purificação de partículas virais. Essas partículas foram injetadas em coelho para a produção do antissoro policlonal. O antissoro produzido mostrou ser específico e útil para testes de detecção (dot- e DAS-ELISA). No ensaio de transmissão por mosca-branca (*Bemisia tabaci* biotipo B ou também conhecido como espécie *Middle East Asia Minor 1*) foi utilizado o mesmo isolado CABYV-M1. Nesse ensaio, foram realizados três tratamentos: AVR (plantas de meloeiro confinadas com moscas-brancas avirulíferas), VIR (plantas de meloeiro confinadas com moscas-brancas virulíferas) e S/MB (plantas de meloeiro livres de moscas-brancas) com 25 plantas por tratamento em três ensaios independentes. Foi utilizado um período de acesso à inoculação (PAA) e de inoculação (PAI) de 48 h. O teste de detecção do CABYV foi realizado por DAS-ELISA com o antissoro produzido e confirmado por RT-PCR com *primers* específicos. O antissoro produzido contra a CP do CABYV foi eficiente na detecção do vírus em extrato bruto de plantas infectadas na concentração de 1 µg/ml de imunoglobulina G. Todas as 75 plantas inoculadas com moscas-brancas virulíferas foram infectadas por CABYV, enquanto nenhuma das 150 plantas inoculadas com moscas-brancas avirulíferas ou sem inoculação foi infectada. Este estudo demonstra o primeiro caso de transmissão de um membro da família *Luteoviridae* por moscas-brancas.

**Palavras-chave:** antissoro policlonal, *Bemisia tabaci*, CABYV, mosca-branca,

**SOROLOGICAL CHARACTERIZATION AND TRANSMISSION BY WHITEFLIES  
(*Bemisia tabaci*) OF THE BRAZILIAN ISOLATE OF *Cucurbit aphid-borne yellows*  
virus (CABYV)**

**ABSTRACT**

*Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) belongs to the genus *Polerovirus* (Family *Luteoviridae*). The genome of this virus consists of a single stranded positive sense RNA, that is encapsidated in an icosahedral particle. The first report of CABYV in Brazil was carried out by Next Generation Sequencing (NGS) (Chapter 2), from melon plants showing “amarelão” symptoms collected in the Northeast region. Molecular characterization of this isolate demonstrated that Brazilian CABYV is a recombinant that has as the major parent a CABYV isolate from France, and, as the minor parent, an unknown polerovirus. In other countries, CABYV is reported to be transmitted by aphids in a persistent and non-propagating manner. It is observed a low population of aphids in melon fields in the Northeast and considering the recombination detected in the region of the coat protein gene (CP) of this virus, a hypothesis was formulated that the Brazilian isolate of CABYV is transmitted by whiteflies. Therefore, the objective of this study was to advance on the characterization of CABYV, including the production of polyclonal antiserum against the CP of this virus, and to evaluate if this CABYV isolate is transmitted by whiteflies. For this, the CABYV-M1 isolate was used for the purification of viral particles. These particles were injected into a rabbit for the production of the polyclonal antiserum. The produced antiserum was shown to be specific and useful for detection tests (dot- and DAS-ELISA). In the whitefly transmission test (*Bemisia tabaci* biotype B or also known as *Middle East Asia Minor 1*), the same CABYV-M1 isolate was used. In this trial, three treatments were carried out: AVR (melon plants confined with aviruliferous whiteflies), VIR (melon plants confined with viruliferous whiteflies) and S / MB (melon plants free of whiteflies) with 25 plants per treatment in three independent trials. An acquisition access period (PAA) and an inoculation access period (PAI) of 48 h was used. The CABYV detection test was performed by DAS-ELISA with the antiserum produced and confirmed by RT-PCR with specific primers. The antiserum produced against CABYV CP was efficient in detecting the virus in crude extract of infected plants at the concentration of 1 µg / ml of immunoglobulin G. All 75 plants inoculated with viruliferous whiteflies were infected by CABYV, while none of the 150 plants inoculated with aviruliferous whiteflies or without inoculation was infected. This study demonstrates the first case of transmission of a member of the family *Luteoviridae* by whiteflies.

**Keywords:** *Bemisia tabaci*, CABYV, polyclonal antiserum, whitefly

### 3.1. INTRODUÇÃO

O *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) pertence ao gênero *Polerovirus*, classificado na família *Luteoviridae*. No início de 2016, um novo isolado de CABYV foi detectado por sequenciamento de nova geração (NGS) em amostras de meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão” na região Nordeste (capítulo 2).

Os critérios taxonômicos em *Polerovirus* são baseados na diferença de amplitude e especificidade na gama de hospedeiros, impossibilidade de proteção cruzada em interações unidirecionais e bidirecionais, diferença superior a 10% de identidade da sequência em aminoácidos de qualquer gene e especificidade sorológica (anticorpo monoclonal e policlonal) (Veerakone *et al.*, 2015; D’Arcy *et al.*, 2000). A relação sorológica é um fator determinante para a classificação de espécies de polerovírus, sendo um dos principais critérios taxonômicos para esse gênero. A sorologia é geralmente o teste de detecção recomendado pela sua alta sensibilidade e baixo custo. Porém, a produção de antissoro específico é difícil para alguns vírus por diversas razões. Por exemplo, o vírus pode ser restrito ao floema e estar presente em baixo título no tecido infectado, a partícula viral pode apresentar sensibilidade a agentes que degradam as proteínas e a transmissão só ocorrer mediante o vetor (Veerakone *et al.*, 2015).

O CABYV é relatado sendo transmitido por afídeo de maneira circulativa não propagativa em diversas regiões do mundo, como na Espanha (Juarez *et al.*, 2004), Estados Unidos (Lemaire *et al.*, 1993), China (Xiang *et al.*, 2008) e Grécia (Organidou *et al.*, 2014). Até o momento não foi relatada a transmissão do CABYV por via mecânica ou por outro inseto (além do afídeo). De forma intrigante, na região onde foi detectado o CABYV verifica-se uma alta infestação de moscas-brancas, porém alta população de afídeos não é observada. Isso levantou uma hipótese do vetor desse vírus ser a mosca-branca. Portanto, o objetivo deste capítulo foi produzir um anticorpo policlonal contra a capa proteica desse vírus e avaliar a

transmissibilidade do isolado brasileiro de CABYV por moscas-brancas.

Foi confirmada por RT-PCR a ausência dos vírus Melon yellowing-associated virus (MYaV), Melon necrotic spot virus (MNSV) e Cowpea mild mottle virus (CPMMV) na planta fonte do CABYV obtida região de Mossoró, utilizando os seguintes *primers*; MYaV (MYaV\_5822Rev ACCCCAGGTGTGTTTTGATATAC e MYaV\_5592For ACGAGGTGTTACCCGATAAATTC), MNSV (MNSV\_2591\_Rev CGATTCAGAGATAGCATCATTGGC e MNSV\_2142\_For AGTTGGCTTGTGTGGCTTATC), CPMMV (CPMMV\_5881\_For GAAATTTACRGGAGAAGTGCC e CPMMV\_6943\_Rev TCTGCCATCTCACTATCCA).

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Estabelecimento de um isolado do *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV)

Amostra de meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão” em lavouras com alta infestação de moscas-brancas foi coletadas em Mossoró (RN), transplantada para vasos e mantidas em casa de vegetação da Embrapa Hortaliças (CNPq). A planta foi pulverizada para eliminar os insetos presentes antes do transplante. Testes posteriores utilizando *primers* (capítulo 1) específicos confirmaram a presença do isolado CABYV-M1.

### 3.2.2. Detecção do CABYV por RT-PCR

A detecção molecular do CABYV foi feita por RT-PCR com os *primers* específicos de detecção 2769 For (AACGCCCTCGGAATTGATCACC) e 3348 Rev (AGACCGCAATTCATTGAGAATGG). Primeiramente, o RNA total de amostras de meloeiro foi extraído utilizando o kit *Plant RNA Reagent* (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, o cDNA foi sintetizado pela transcriptase reversa M-MLV (Thermo Fisher Scientific). A reação consistiu de 10 µL de RNA total, 1 µL de primer randômico (50 mM), 1

$\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM) e incubada por  $75^\circ$  por 5 minutos. Após isso, foram adicionados 4  $\mu\text{L}$  do tampão (5X), 2  $\mu\text{L}$  de DTT (0,1M), 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV (200U/ $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de RNaseOUT (Thermo Fisher Scientific, 40 U/ $\mu\text{L}$ ). A reação final foi incubada por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  e posteriormente a  $75^\circ\text{C}$  por 15 minutos para inativação da enzima. Em seguida, o cDNA viral foi amplificado por PCR, utilizando os *primers* específicos de CABYV, com a enzima *Taq* DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções da fabricante. A temperatura de anelamento dos *primers* foi de  $51^\circ\text{C}$ . A confirmação da amplificação do DNA do tamanho esperado de 579 nucleotídeos foi feita pela análise por eletroforese em gel de agarose a 1%.

### **3.2.3. Criação de moscas-brancas (*Bemisia tabaci* biótipo B)**

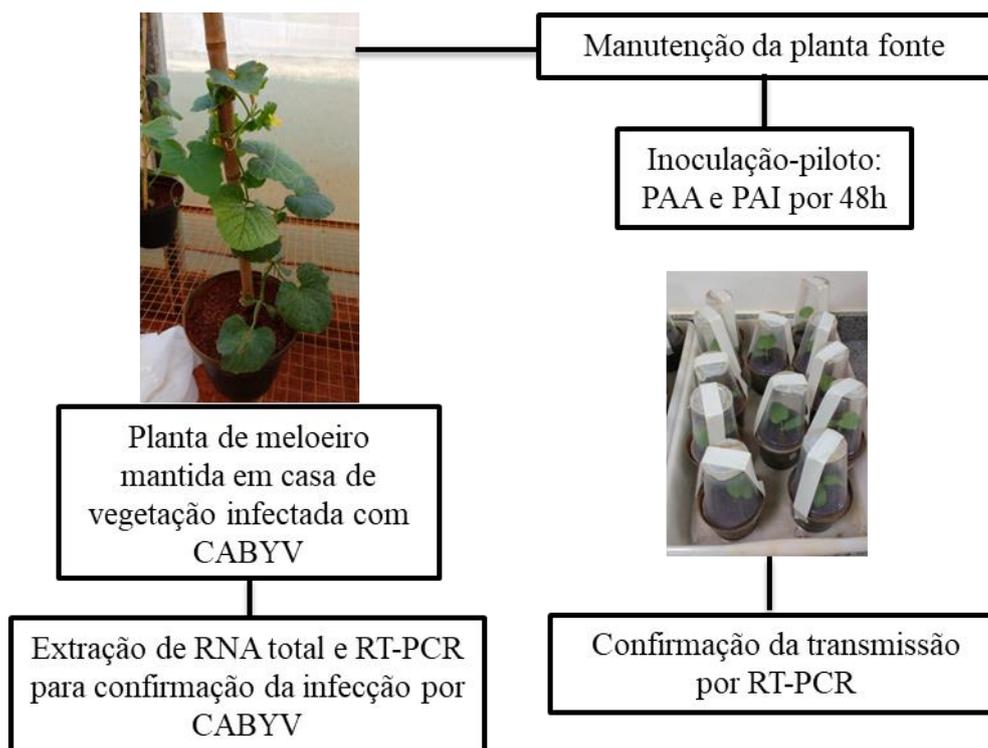
As moscas-brancas utilizadas nos experimentos seguintes de transmissão foram provenientes da criação de *B. tabaci* biótipo B mantida na unidade do CNPH. Os insetos são mantidos em casa-de-vegetação em plantas de repolho (*Brassica oleraceae* var. capitata).

### **3.2.4. Ensaio-piloto de transmissão por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) do isolado brasileiro de CABYV**

Inicialmente, para testar a hipótese de que o CABYV é transmitido por mosca-branca, um ensaio-piloto foi realizado. Neste ensaio preliminar foram usadas 14 plantas de meloeiro saudáveis, sendo sete plantas para o teste de inoculação e as outras sete usadas como controle negativo do experimento. Foram utilizadas 30 moscas-brancas por planta no processo de inoculação (moscas-brancas virulíferas) e as plantas controles foram mantidas livres do inseto.

Para o período de acesso à aquisição (PAA), moscas brancas mantidas em plantas saudáveis no criatório do CNPH (avirulíferas, moscas-brancas livres de vírus) foram transferidas por sucção para tubos de polietileno de 50 mL, contendo um folíolo proveniente das plantas fontes (plantas em que a infecção do CABYV foi previamente confirmada), em suporte de

meio ágar 1%. Em média foram transferidos para cada tubo um total de 200 insetos. O PAA foi constituído de 48 h. Após o PAA, moscas-brancas virulíferas foram transferidas para plantas saudas de meloeiro com 7 dias de germinação, apresentando a primeira folha verdadeira. O confinamento foi realizado em plantas em vasos, utilizando copos plásticos de 500 mL com o fundo substituído por tecido de organza e colocados de forma invertida sobre os vasos. As plantas foram inoculadas por um período de acesso a inoculação (PAI) de 48h. Após o PAI, as moscas-brancas foram eliminadas mecanicamente e as plantas foram mantidas em câmara de crescimento (25°C +/- 2 e 12 horas de fotoperíodo) livre de insetos. Para o controle deste ensaio, sete plantas de meloeiro saudas foram mantidas livres de inseto. O PAA e PAI de 48 h adotado neste experimento-piloto de transmissão foram baseados considerando o tipo de relação com vetor afídeo (circulativo não propagativo) que o CABYV relatado fora do Brasil possui. A infecção viral foi avaliada 15 dias após a inoculação (DPI) por RT-PCR utilizando *primers* específicos para detectar o CABYV.



**Figura 1.** Ilustração do passo-a-passo do ensaio-piloto de transmissão do CABYV por mosca-branca a partir de meloeiro infectado oriundo de Mossoró (RN).

### 3.2.5. Purificação de partícula viral

#### - Obtenção de plantas propagativas utilizadas na purificação de partícula

Para obtenção de plantas de meloeiro infectadas para a produção de antissoro, as plantas de propagação viral foram infectadas por inoculação por moscas-brancas a partir de plantas fontes obtidas no ensaio-piloto de transmissão (descrito no item anterior). Para isso, moscas-brancas avirulíferas foram mantidas por 48h em plantas infectadas para o período de acesso a aquisição (PAA) do vírus. Após isso, as moscas-brancas virulíferas foram transferidas para gaiolas contendo plantas de meloeiro saudas com 7 dias de idade e mantidas por 48 horas para realização do processo de inoculação viral e obtenção de alto número de plantas infectadas para procedimento de purificação de partícula viral. Para confirmar a infecção, plantas de meloeiro foram selecionadas aleatoriamente com 15 dias após a inoculação (DPI) para detecção do CABYV por RT-PCR com *primers* específicos. Com 20

DPI, depois de confirmada a infecção, todas as plantas (folhas e caules) foram coletadas e armazenadas a -80 C.

### **- Purificação**

O protocolo de purificação foi adaptado de Takanami & Kubo (1979) e foram realizadas quatro vezes para obtenção de partículas necessárias para a produção do antissoro policlonal. Para a purificação de partícula do CABYV, primeiramente foi macerada cerca de 200 g de tecido vegetal em nitrogênio líquido. Após isso, o material triturado foi homogeneizado em tampão citrato (0,1 M, pH 6) contendo mercaptoetanol (2mL/L), macerozima (2g/L) e celulose (2g/L). Em seguida, o homogeneizado foi incubado a 28° C por 4h sob agitação a 80 rpm e emulsionado com uma mistura igual de clorofórmio-butanol (1/5 do volume do extrato) por 10 min. a 80 rpm. Para precipitar o resíduo vegetal, o emulsionado foi centrifugado a 6000 rpm (tubos de 200 mL JA 14) por 15 min. A fase aquosa resultante desta centrifugação foi separada e tratada com 8% de polietileno glicol 4000 (PEG), NaCl (0,4M) e agitada a 8° C por 1h. Após a agitação, a solução foi mantida em repouso por 1h a temperatura ambiente (TA). Em seguida, foi feita uma centrifugação (16000 g) por 15min. a 15° C. O pellet obtido foi ressuspendido em 40 mL de tampão borato de sódio (0,01M, pH 8,2), contendo EDTA 0,001M e após isso, para remover o material não ressuspendido, o extrato foi submetido a uma centrifugação a 16000 g por 15 min. O sobrenadante foi separado e adicionado a um colchão de sacarose (20%) e ultracentrifugado a 110000 g por 4h. O pellet obtido neste colchão foi dissolvido em tampão fosfato de potássio (0,01M, pH 7,2) e submetido a um *spin down*. A suspensão obtida proveniente do *spin down* foi colocada em gradiente de sacarose de 10 a 40% em tubos SW-41 (Beckman Coulter, Brea, EUA). Para obtenção da banda contendo partículas virais, os tubos foram ultracentrifugados a 32000 rpm durante 4h em rotor SW-41. A fração da solução em gradiente apresentando opacidade foi

recolhida com seringa e centrifugada a 105000 x g por 2h e em seguida ressuspensa e armazenada a -80°C.

#### **- Produção de antissoro policlonal**

Foram utilizadas as partículas produzidas no item 2.6 para produção de antissoro policlonal específico contra o CABYV. A produção do anticorpo foi realizada com a imunização de um coelho, através de injeções subcutâneas no dorso do coelho das partículas purificadas previamente emulsificadas com adjuvante completo de Freund's na primeira injeção e adjuvante incompleto a partir da segunda injeção. Foram realizadas três injeções para a imunização, sendo uma injeção a cada 14 dias. Foram injetados 0,17 mg de partículas virais por injeção.

Depois de realizar as três injeções, a coleta de sangue foi realizada uma vez por semana após a última imunização através de pequenas perfurações nas orelhas do coelho. Esse procedimento foi repetido cinco vezes retirando-se por vez cerca de 15 mL de sangue. A cada coleta, o sangue foi mantido a 37° C por 1h e refrigerado a 4° C por 15 a 20 minutos. A seguir, o sangue foi submetido à centrifugação de 10 000 g por 8 minutos para formação do sobrenadante contendo o antissoro bruto e eliminação da fração precipitada que correspondente à parte coagulada. Este sobrenadante foi então coletado e armazenado a - 20° C para testes posteriores de dot-ELISA para avaliar a eficiência do antissoro bruto produzido.

Ao soro bruto (1 mL) adicionou-se 9 mL de água destilada, e a esta mistura foi adicionada gota-a-gota 10 mL de solução saturada de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) e incubada a TA por 1 h, protegida da luz. Depois disso, a solução foi centrifugada a 9.400 g por 10 min, a uma temperatura de 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e manteve-se o sedimento em gelo. Este foi dissolvido em 1 mL de ½ PBS (PBS 10 X = 1,4 M NaCl + 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 8 mM NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O + 2 mM KCl, pH 7,4). A solução resultante foi dialisada três vezes (Dialysis Tubing, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em ½ PBS, por 14 a 16h. Depois

de dialisar, a imunoglobulina foi purificada com a resina (DEAE Sephacel™ Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). Uma coluna foi formada com a resina DEAE Sephacel™ e lavada com ½ PBS para equilibrar em pH 7,0. O antissoro foi adicionado nesta coluna e em seguida foi adicionando ½ PBS, posteriormente a IgG foi coletada e a absorbância foi medida. Após a leitura da absorbância a 280 nm, a IgG foi diluída para a concentração de 1 mg/mL e armazenada a – 20 °C.

Para testes posteriores de detecção por DAS-ELISA, a IgG purificada foi conjugada com a fosfatase alcalina para obtenção da IgG-conjugada. Para isso, 400 µL da IgG (1,4 mg/mL) foi adicionada à cerca de 4000 U da enzima alcalina fosfatase (Sigma-Aldrich, Brasil) e colocados em tubo de diálise (Sigma-Aldrich). Posteriormente, o material foi dialisado em solução de glutaraldeído 0,05 % em tampão ½ PBS e incubados a TA, protegido de luz, por 4 h com rotação permanente de 30 rpm. Após isso, foi feita diálise com ½ PBS.

Para avaliar a eficiência e determinação da concentração ótima de uso em teste sorológico da IgG e da IgG-conjugada, foi feito o teste DAS-ELISA.

### **3.2.6. Análise da eficiência do antissoro**

#### **3.2.6.1. Teste por Dot-ELISA para avaliar a eficiência do antissoro bruto e da IgG purificada**

Amostras foliares de meloeiro infectadas e sadias foram maceradas em tampão TBS 1X (Tris-base 0,02 M, NaCl 0,05 M, pH 7,5) na proporção 1:10 e o extrato vegetal foi aplicado em membrana de nitrocelulose (Immobilon NC, 0,45µm, Millipore, Burlington, EUA). Após isso, as membranas foram mantidas a TA por 30 min para secagem e depois foram armazenadas na geladeira ou imediatamente processadas. Primeiramente, a membrana foi incubada em solução bloqueadora (tampão 1X TBS, 5% de leite em pó desnatado) por 2h a TA sob agitação permanente. Em seguida, adicionou-se à solução bloqueadora o antissoro policlonal produzido (item 2.7.) na concentração final 1µg/mL e em seguida incubado *overnight* sob agitação leve à TA. Após isso, foi feita lavagem da membrana por três vezes

com o tampão TBS 1X + 0,05% tween-20, sob agitação. Após isso, a membrana foi incubada na solução constituída de TBE 1X contendo anti-IgG anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (Antirabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate, Sigma-Aldrich) diluído 1:30000 e incubado por 4h a TA sob agitação. Em seguida, para remoção de anti-IgG livre, as membranas foram lavadas três vezes com o tampão TBS 1X + 0,05% tween-20, sob agitação. Para avaliar a interação antígeno-anticorpo, foi adicionando o tampão de revelação alcalino (100 mM NaCl + 100 mM Tris-base + 5 mM MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O), pH 9,5), 0,165 mg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3- indolil, Sigma) e 0,33 mg/mL de NBT (nitro blue tetrazolium chloride, Sigma-Aldrich). Durante a revelação, a membrana foi incubada em condição de baixa luminosidade, sob agitação lenta, por 10 a 15 minutos. Após isso, a membrana foi incubada em água para inibir a reação da enzima e avaliada com relação a mudança de coloração da amostra comparada com o controle positivo (planta infectada) e negativo (planta sadia).

Para avaliar a eficiência e especificidade do antissoro bruto e do IgG purificado anti-CP de CABYV produzido no item 2.5., foi feito o teste de dot-ELISA. Para isso, foi utilizado o antissoro bruto proveniente da 1<sup>a</sup> sangria e a IgG purificada a partir desta sangria. Foram utilizadas as diluições 1/500, 1/1000 e 1/2000 para avaliar o antissoro bruto e a IgG purificada.

### **3.2.6.2. Teste da eficiência da IgG-conjugada por DAS-ELISA**

Este teste foi feito a partir do IgG purificado da primeira sangria utilizando o método de DAS-ELISA. Inicialmente, em duplicata, adicionou-se nas cavidades de placa de poliestireno 200 µL de IgG (1 mg/mL) na diluição 1:1000 diluído em tampão carbonato (pH 9,6). Após isso, a placa foi incubada por 4h a 37° C e em seguida foi adicionado nas cavidades da placa 200 µL do extrato de folhas de meloeiro infectadas com o isolado brasileiro de CABYV, diluídas nas concentrações 1:10 e 1:100 em tampão de extração (½

PBS). Foi adicionado também extrato de meloeiro sadio nas mesmas diluições. Após isso, a placa foi incubada por 16 h por 4°C e em seguida lavada três vezes com tampão PBS-Tween. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de IgG-conjugada à fosfatase alcalina, nas diluições 1:500; 1:1000 e 1:2000, diluídas em tampão PBS-Tween, e incubado por 4 h a 37 °C. Após esta etapa, as placas foram lavadas por três vezes com PBS-Tween. Para revelação, aplicou-se nos poços da placa 200 µL de substrato *p*-nitrofenil fosfato (Sigma- Aldrich) 0,7 mg/mL diluídos em tampão dietanolamina e a placa foi incubada no escuro, à TA, sendo os valores de absorbância medidos a 405 nm de comprimento de onda em leitora de placas de ELISA.

### **3.2.7. Transmissão do isolado brasileiro de CABYV por mosca branca (*Bemisia tabaci*)**

#### **3.2.7.1 Detecção do CABYV em mosca branca utilizadas nos ensaios**

Cerca de 50 moscas-brancas (*B. tabaci* biotipo B), mantidas no criatório do CNHP e moscas-brancas utilizadas nos tratamentos AVR (plantas confinadas com moscas avirulíferas), VIR (plantas confinadas com moscas virulíferas) e S/MB (plantas confinadas sem moscas), foram coletadas por sucção e transferidas para tubo de 1,5 mL. Estas foram submetidas à extração de RNA total com o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante, com adaptações, como se segue. As moscas-brancas foram maceradas com pistilos plásticos em 250 µL de Trizol® e a reação foi incubada por 5 min a temperatura ambiente. Após isso, adicionou-se 25 µL da solução 24:1 de clorofórmio-álcool isoamílico, misturou-se em agitação e foi incubado em gelo por 5 min. O macerado foi centrifugado a 4° C por 15 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi separado e foi adicionado isopropanol na proporção 1:1 com relação à fase aquosa resultante e misturado. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado com 500 µL etanol 70% sob uma centrifugação de

12.000 rpm por 5 min. Por fim, o etanol foi descartado e o pellet foi ressuspenso com 30 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q autoclavada. Para detecção do CABYV na mosca-branca, foi feita síntese do cDNA com *primer* randômico e a PCR foi realizada com *primers* específicos Polero\_2769\_For (AACGCCTTCGGAATTGATCACC) e Polero\_3348\_Rev (AGACCGCAATTCATTGAGAATGG) de CABYV com a enzima *Taq* DNA polymerase (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil), seguindo as instruções da fabricante.

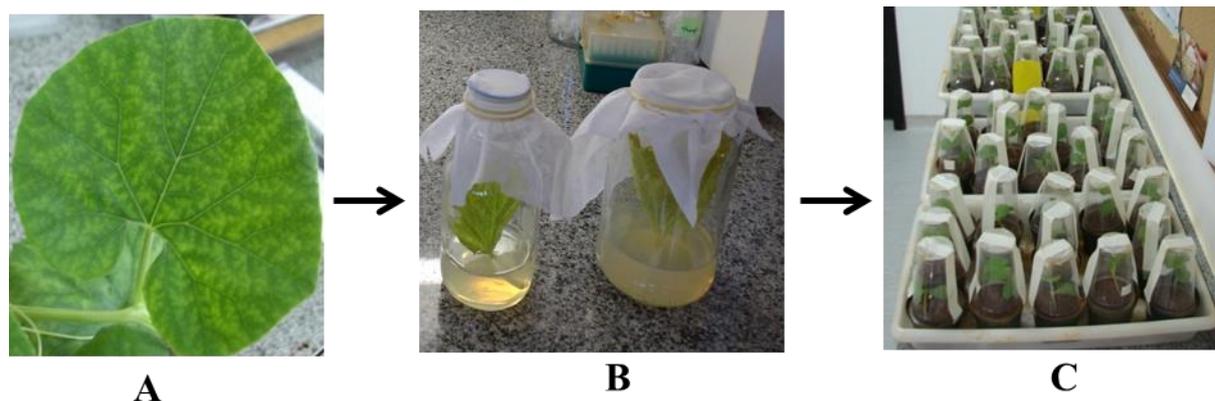
### **3.2.7.2. Ensaio de transmissão do CABYV por mosca-branca em condições controladas**

Moscas-brancas utilizadas neste experimento eram mantidas em repolho em casa de vegetação da Embrapa Hortaliças. Inicialmente, foi feito teste de detecção do CABYV por RT-PCR para confirmar a ausência do vírus na colônia de moscas-brancas utilizadas neste experimento. O ensaio de transmissão foi realizado em três repetições independentes, com três tratamentos. Como controle do experimento, foram utilizadas plantas mantidas com moscas-brancas avirulíferas e plantas que não receberam moscas-brancas. Ou seja, foram três tratamentos por repetição: i. plantas incubadas com moscas-brancas virulíferas (VIR), ii. plantas incubadas com moscas-brancas avirulíferas (AVR), e iii. plantas que não receberam moscas (S/MB). Foram utilizadas 25 plantas por tratamento nas três repetições, totalizando 225 plantas de meloeiro em todo o experimento. Foi utilizada a cultivar Goldex de meloeiro neste ensaio de transmissão com mudas de sete dias de idade, apresentando a primeira folha verdadeira. Após a germinação, as mudas foram mantidas em câmara de crescimento (25°C +/- 2 e 12 horas de fotoperíodo) protegida de insetos para evitar risco de contaminação.

Após a confirmação da ausência do CABYV nas moscas amostradas, adultos da mesma criação foram colocados para se alimentarem em folhas provenientes de plantas-fonte nas quais a infecção do CABYV foi previamente confirmada. As folhas utilizadas foram condicionadas em frascos de 300 a 500 mL de vidro ou plástico, sob um suporte de meio ágar

1% (Fig. 2A). Para o PAA, em cada recipiente foram adicionadas moscas-brancas avirulíferas provenientes do criatório para se alimentar nas folhas infectadas por um tempo de 48 h, como ilustrado na figura 2A e B. A colocação das moscas-brancas nos frascos foi feita por sucção com o auxílio de um sugador acoplado com uma ventoinha com pressão negativa. Foram colocados aproximadamente 500 insetos por frasco para garantir a quantidade mínima no processo de inoculação (Fig. 2B). A porção aberta do frasco (tampa) foi vedada com tecido organza que permite a troca de ar. Para realizar a inoculação, primeiramente, as moscas-brancas foram excitadas para se deslocarem para a parede do frasco, para em seguida serem cuidadosamente capturadas por sucção. Esse procedimento minimiza possíveis danos ao aparelho bucal e conseqüentes dificuldades na alimentação e transmissão do vírus na inoculação. Então, a inoculação foi realizada a partir de cerca de 30 moscas-brancas que foram confinadas com copo plástico de 500 mL que permite aeração (Fig. 2C). Após transferir as moscas-brancas virulíferas para as plantas sadias de meloeiro, foi aplicado um PAI de 48 h para transmissão do CABYV. Como controle, as moscas-brancas avirulíferas foram transferidas da mesma forma para meloeiros sadios com o mesmo PAA e PAI de 48 h. Após o PAI, as moscas-brancas foram eliminadas mecanicamente. Após 15 dias da inoculação, foi feita detecção de CABYV por DAS-ELISA para avaliar a transmissão do CABYV.

As plantas foram mantidas em câmara de crescimento com luminosidade controlada (25°C +/- 2 e 12 horas de fotoperíodo) e livre de insetos. O acompanhamento do desenvolvimento de sintomas foi realizado ao longo da incubação para avaliar o tempo para expressão de sintomas e o tipo de sintomas.



**Figura 2.** Ilustração do ensaio de transmissão por mosca-branca do isolado brasileiro de CABYV em condições controladas. **A.** Exemplo de folha de meloeiro infectada com o CABYV utilizada para a aquisição viral. **B.** Frascos em que foi acondicionada a folha infectada para confinamento das moscas-brancas avirulíferas para o PAA por 48 h. **C.** Plantas de meloeiro confinadas com moscas-brancas virulíferas no processo de inoculação por 48 h.

### **3.2.7.3. Detecção por DAS-ELISA do CABYV nas amostras do ensaio de transmissão com mosca-branca**

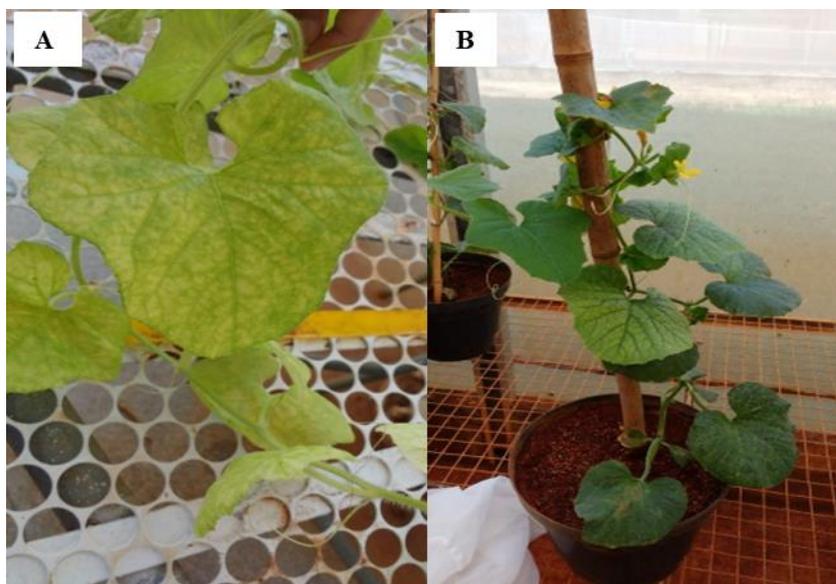
A detecção do CABYV nas plantas do ensaio de transmissão foi realizada por DAS-ELISA como descrito no item 2.7 deste capítulo com a IgG-conjugada. Foi utilizada IgG-conjugada na diluição 1:1000.

## **3.3. RESULTADOS**

### **3.3.1. Origem do isolado**

Uma das plantas provenientes do campo de Mossoró (RN) foi mantida em casa de vegetação e foi multiplicada através da propagação de hastes da planta em vaso. Cerca de 14 dias após a propagação houve a formação de raízes e foram feitas novas plantas-fonte pelo mesmo método. A planta em infecção simples do CABYV (confirmada por testes moleculares e sorológicos contra os principais vírus de cucurbitáceas, dados não mostrados) apresentava sintomas severos de clorose interveinal nas folhas mais velhas com 20 dias de enraizamento (Fig. 3A). Esta planta foi propagada vegetativamente e após se desenvolver apresentou

clorose interneval nas folhas baixeras (figura 3B).

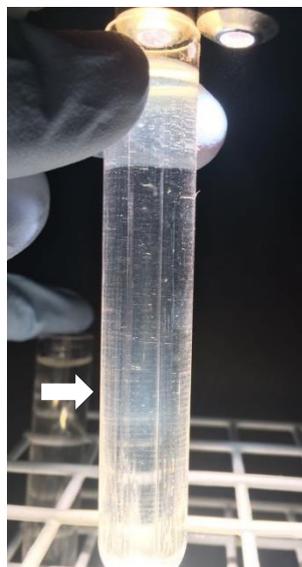


**Figura 3.** Isolado de meloeiro infectado com o isolado brasileiro de CABYV apresentando sintoma de forte clorose nas folhas mais velhas. **A.** Planta proveniente de Mossoró (RN) mantida em casa de vegetação com forte sintoma de clorose. **B.** Planta-fonte de meloeiro propagada vegetativamente a partir da planta do campo. Nesta planta observa-se sintoma de clorose internerval nas folhas médias.

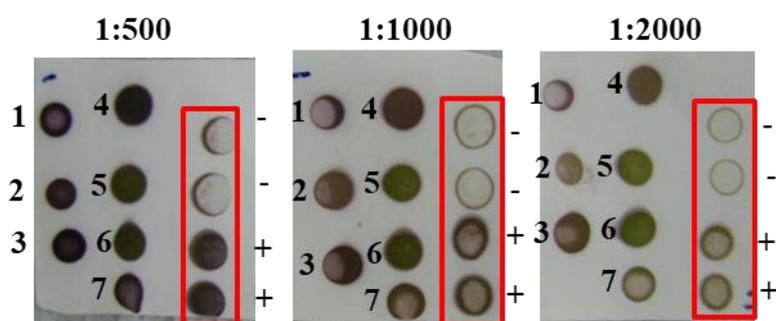
### 3.3.2. Antissoro policlonal produzido

Foram realizadas quatro purificações de partículas virais, a partir da coleta de uma banda opalescente na metade inferior do gradiente de sacarose (Fig. 4,) obtendo-se cerca de 1,4 mg de vírions purificados, que foram divididos em três injeções de ~0.4 mg cada. Foi avaliada a reatividade e sensibilidade do antissoro produto por dot-ELISA com diferentes diluições do antissoro bruto e da IgG purificada (1:500, 1:1000, 1:2000, Fig. 5). O antissoro bruto purificado demonstrou reatividade com a CP do isolado brasileiro de CABYV em extratos de plantas de meloeiro (cv. Goldex) infectadas e o nível de reação cruzada foi baixa com plantas saudáveis de meloeiro em todas as diluições (Fig. 5). Os resultados foram semelhantes no teste de detecção utilizando a IgG purificada do antissoro bruto a partir de plantas infectadas com o CABYV (Fig. 6). O resultado demonstrou que no antissoro da 1ª sangria já foi possível obter a IgG anti-CP reativa ao CABYV nas três diluições testadas e

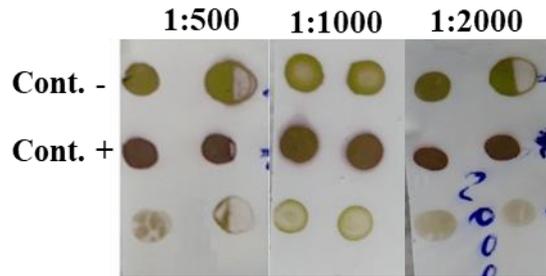
sem reação com planta sadia, como demonstrado no teste de dot-ELISA na figura. 6.



**Figura 4.** Purificação da partícula do isolado brasileiro de CABYV a partir do extrato foliar infectado de meloeiro (*C. melo*) após a centrifugação em gradiente de sacarose. A seta indica a banda viral do isolado de CABYV em tubo com gradiente de sacarose de 10-40% que foi coletada para precipitação.

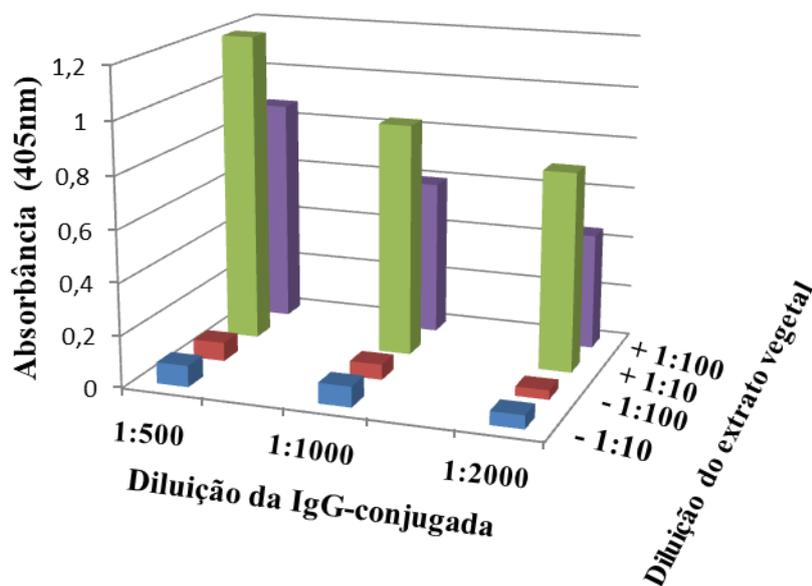


**Figura 5.** Teste de dot-ELISA para avaliar a reatividade do antissoro bruto proveniente da 1ª sangria do coelho imunizado com partículas virais purificadas do isolado brasileiro de CABYV nas diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000. Foi utilizado extrato bruto de folhas infectadas (controle +) e sadias (controle sadio) como controle de meloeiro para avaliar a reação do antissoro bruto. Foi utilizado um mix de planta sadia e infectada. Dots 1, 2, 4 e 7 são de amostras de meloeiros infectadas e poços 5 e 6 de plantas sadias.



**Figura 6.** Teste de dot-ELISA para avaliar a reatividade da IgG purificada a partir do antissoro bruto proveniente da 1ª sangria nas diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000. Foi utilizado extrato bruto de folhas infectadas e sadias de meloeiro para avaliar a reação do antissoro. Os controles positivo e negativo do teste são de plantas infectadas e sadias.

Após confirmar que o antissoro bruto reage positivamente com o extrato de planta infectada, foi feita a purificação da IgG e a conjugação da mesma com a enzima fosfatase alcalina. A eficiência e especificidade da IgG-conjugada foi avaliada nas diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000 em DAS-ELISA. O extrato de meloeiro sadio (-) e infectado (+) foi avaliado nas diluições 1:10 e 1:100. As amostras foram aplicadas em triplicada e para facilitar análise foi feita uma média do valor de absorbância das amostras. Foi observado que nas três diluições utilizadas, o antissoro conjugado reagiu com extrato de plantas infectadas com o CABYV, sendo que se utilizou como critério de separação o valor de três vezes a média do controle negativo, que foi de 0,23, sendo considerada positiva a reação acima desta absorbância. A média da absorbância da reação positiva nas diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000 foi de 1,2, 0,9 e 0,4, respectivamente, para a diluição do extrato vegetal 1:10, e para a diluição 1:100 do extrato a média foi de 0,8, 0,6 e 0,2. Os testes de avaliação da IgG-conjugada foram realizados por DAS-ELISA, com a avaliação das diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000. Não foi observada reação com o extrato de planta sadia. A detecção do vírus foi realizada em uma diluição de até 1:2000 da IgG conjugada (Fig. 8), sem diferenças dentre diluições do antígeno. A diluição selecionada para uso em detecção foi de 1:1000 para a IgG-conjugada.



**Figura 8.** Resultado em absorvância no teste DAS-ELISA para avaliação da imunoglobulina G conjugada à fosfatase alcalina (IgG-conjugada) contra a capa protéica do isolado brasileiro de CABYV, cerca de 3 h após a adição do substrato da enzima fosfatase alcalina. A IgG-conjugada foi testada nas diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000. O antígeno (extrato bruto) foi testado nas diluições 1:10 e 1:100. As barras verdes e roxas representam os antígenos de extrato de meloeiro infectado com o CABYV nas diluições 1:10 e 1:100, respectivamente. As barras azuis e vermelhas representam o controle negativo (meloeiro sadio) também diluído a 1:10 e 1:100, respectivamente.

### 3.3.3. Ensaio-piloto de transmissão do isolado brasileiro de *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) por mosca branca (*Bemisia tabaci*)

Foi realizado um ensaio-piloto para avaliar se o CABYV brasileiro é transmitido por moscas-brancas para meloeiro (cv. Goldex). A confirmação da infecção foi feita por teste de detecção por RT-PCR com *primers* específicos do CABYV nas amostras de meloeiro inoculadas e não inoculadas. Todas as sete plantas inoculadas por moscas-brancas virulíferas foram positivas para o CABYV (Tabela 1) com a amplificação de DNA de 579 nt (Fig. 9), indicando transmissão em 100% das plantas. Nas plantas controles mantidas sem moscas brancas, o vírus não foi detectado em nenhuma das sete plantas (Tabela 1).

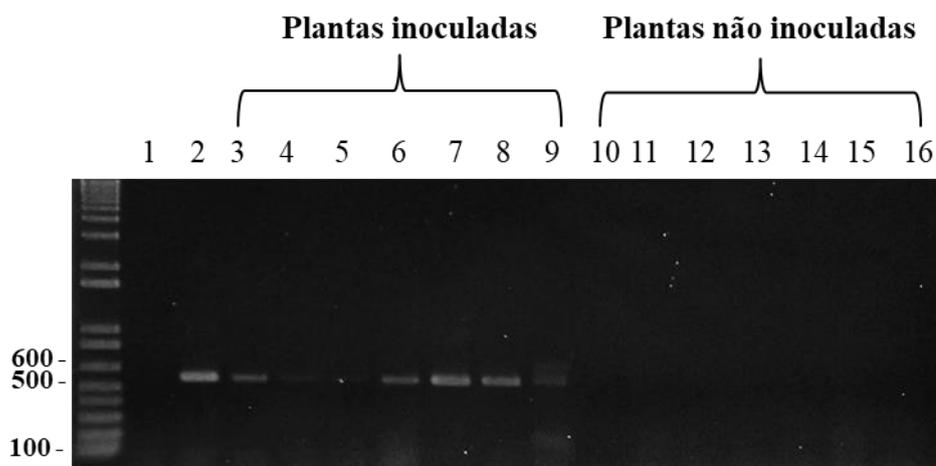
A partir deste resultado, a produção de antissoro foi realizada com plantas de meloeiro

infectadas com o CABYV a partir da transmissão por moscas-brancas e posteriormente um ensaio em condições controladas de transmissão do CABYV foi realizado.

**Tabela 1.** Resultado do ensaio piloto de transmissão por mosca branca do isolado brasileiro de CABYV.

Meloeiro	Inoculadas	Não inoculadas
cv. Goldex	7/7	0/7

Inoculadas: de 7 plantas inoculadas, todas foram infectadas; Não inoculadas: as 7 plantas controles não inoculadas mantiveram-se sadias.



**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação por RT-PCR do CABYV a partir das amostras de meloeiro do ensaio-piloto de transmissão por mosca-branca. Poço 1 apresenta o produto da amplificação de amostra negativa (água milli-Q autoclavada); o poço 2 de RNA de planta sabidamente infectada, como controle positivo. Poços 3 a 9 representam as sete plantas inoculadas por moscas-brancas virulíferas. Poços 10 a 16 representam as plantas não inoculadas, ou seja, que foram mantidas livres de inseto. O tamanho da banda esperada é de 579 nt. M: marcador 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

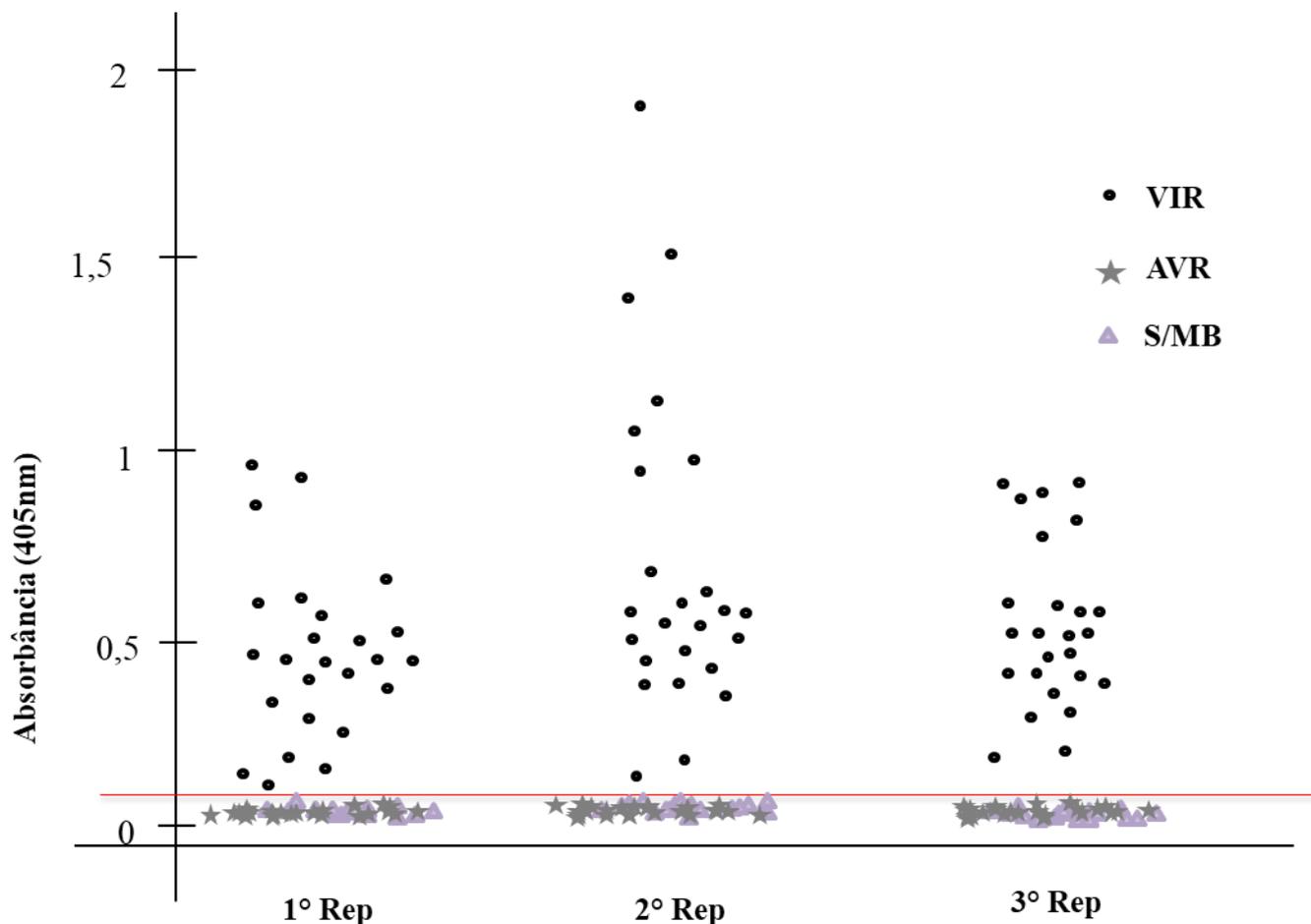
### **3.3.4. Ensaio de transmissão do isolado brasileiro de CABYV por mosca branca (*B. tabaci*) em condições controladas**

Este ensaio foi realizado com três tratamentos: plantas confinadas com moscas-brancas virulíferas (VIR), plantas confinadas com moscas-brancas avirulíferas (AVR) e plantas que não foram confinadas com moscas-brancas (S/MB). O PAI e PAA deste experimento foram de 48 h e a o teste de detecção do vírus foi realizado 15 dias após a inoculação. O ensaio foi repetido três vezes.

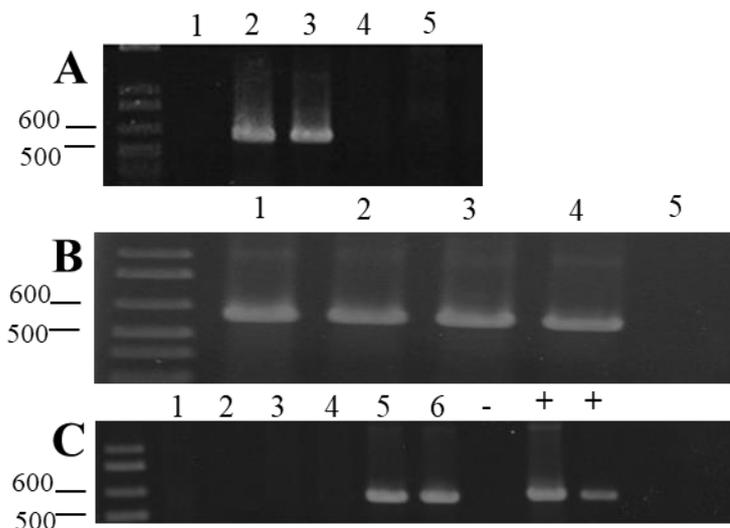
O teste de detecção baseado em DAS-ELISA foi realizado em todas as 25 plantas de cada tratamento e de cada repetição. Foi considerada positiva a amostra que apresentou valor de absorvância maior do que a média do valor de absorvância do controle negativo (extrato de meloeiro sadio) multiplicada por três. O valor da média de absorvância multiplicado por três do controle negativo de todos os tratamentos (VIR, AVR e S/MB) nas três repetições variou de 0,13 – 0,20 (Tab.2). No teste de detecção do CABYV por DAS-ELISA utilizando a IgG-conjugada produzida, foi observado que todas as plantas que receberam moscas-brancas virulíferas mostraram-se positivas para o isolado de CABYV brasileiro (Fig. 10). O valor de absorvância nas três repetições nas plantas inoculadas (tratamento VIR) variou de 0,22 a 1,87 (Fig. 10; Tab. 2). O gráfico da figura 10 mostra a distribuição da absorvância das amostras distribuídas por repetição em que todas as amostras inoculadas (VIR) ficaram localizadas acima do limiar (linha vermelha) de separação entre detecção positiva e negativa, sendo assim consideradas plantas infectadas. A linha vermelha representa o valor médio (0,14) da absorvância de todos os controles negativos utilizados nos tratamentos multiplicado por três. As plantas utilizadas como controle negativo (com o confinamento das plantas com moscas-brancas que não entraram em contato com plantas infectadas – tratamento AVR) não expressaram sintomas e não se infectaram, confirmando que as moscas-brancas não estavam virulíferas. As plantas que não receberam moscas (tratamento S/MB) também foram negativas no teste por sorologia. O valor de absorvância dos tratamentos AVR e S/MB nas três

repetições variou de 0,01 a 0,07 e 0,01 a 0,10, respectivamente, indicando que todas as amostras apresentaram valor de absorvância abaixo do limiar (0,14) do controle negativo.

Foram feitos testes de detecção por RT-PCR utilizando *primers* específicos (*amplicon* de 579 nt) nas plantas de repolho e nas moscas-brancas do criatório do CNPH antes de realizar os experimentos. Também foi feito RT-PCR para detectar o CABYV brasileiro nas plantas-fonte de inóculo do vírus e nas moscas-brancas após PAA e PAI organizadas em *pool* das três repetições. Não foi detectado o vírus nas plantas de repolho e moscas-brancas do criatório, descartando possíveis contaminações externas (Fig. 11A). Confirmou-se a presença do vírus no pool de moscas-brancas que se alimentaram em plantas infectadas, e confirmou-se a ausência de vírus nas moscas-brancas utilizadas no tratamento AVR, tratamento em que plantas de meloeiro foram confinadas com moscas-brancas avirulíferas (moscas que se alimentaram em plantas saudáveis, Fig. 11A). A infecção nas plantas-fonte de vírus foi confirmada (Fig. 11B). Não foi detectado o vírus em pool de amostras de plantas coletadas aleatoriamente nos tratamentos AVR e S/MB, assegurando a eficácia do controle do experimento (Fig. 11C). O CABYV foi detectado por RT-PCR em plantas inoculadas nas três repetições e organizadas em *pool* (Fig. 11C), corroborando com o resultado do teste de detecção por DAS-ELISA.



**Figura 10.** Gráfico representando a leitura de absorvância de cada uma das amostras avaliadas por DAS-ELISA em teste de detecção do isolado brasileiro de CABYV nos tratamentos VIR, AVR e S/MB nas três repetições do experimento. VIR (círculo): representa as plantas de meloeiro inoculadas com moscas-brancas virulíferas, AVR (estrela): representa plantas de meloeiro confinadas com moscas-brancas avirulíferas e S/MB (triângulo): representa plantas de meloeiro livres de insetos. Foram consideradas infectadas (amostras positivas) as amostras que apresentaram valor de absorvância três vezes acima da média do controle negativo (0,14), que está representado pela linha vermelha. A leitura da absorvância foi a 405nm.



**Figura 11.** Detecção por RT-PCR de CABYV com *primers* específicos (*amplicon* de 579 nt) a partir de RNA extraído de insetos e plantas. **A.** Poços 1 e 2: controle negativo e positivo da reação, respectivamente; Poços 3 e 4, pool de cerca de 50 moscas virulíferas (tratamento VIR) e pool de cerca de 50 moscas-brancas avirulíferas (tratamento AVR) após inoculação, respectivamente; Poço 5: pool de moscas-brancas de plantas de repolho do criatório de moscas-brancas. **B.** Poços 1 a 3: plantas-fonte de meloeiro do isolado brasileiro de CABYV. Poços 4 e 5 são o controle positivo e negativo, respectivamente. **C.** RT-PCR a partir de pool de plantas selecionadas aleatoriamente dos tratamentos AVR (plantas que receberam moscas avirulíferas), VIR (plantas que receberam moscas virulíferas) e S/MB (plantas que não receberam inseto): Poços 1 e 2, pool de plantas das três repetições do tratamento AVR; poços 3 e 4, pool de plantas das três repetições do tratamento S/MB (livres de insetos); poços 5 e 6, pool de plantas das três repetições do tratamento VIR (plantas inoculadas); - e + representam o controle negativo e positivo da reação. M: marcador 1 kb plus ladder (Invitrogen).

**Tabela 2.** Valores de absorbância das amostras do ensaio de transmissão do isolado brasileiro de CABYV por mosca branca pelo teste DAS-ELISA

---

<b>1ª Repetição</b>			
	<b>Abs. amostras</b>	<b>Abs. cont -</b>	<b>Abs. cont +</b>
VIR	0.220-0.947	0.036-0.072 (0.156*)	0.984-1.226
AVR	0.022-0.060	0.041-0.078 (0.116*)	0.838-1.087
S/MB	0.014-0.093	0.050-0.093 (0.121*)	0.745-1.146

<b>2ª Repetição</b>			
	<b>Abs. amostras</b>	<b>Abs. cont -</b>	<b>Abs. cont +</b>
VIR	0.218-1.869	0.046-0.060 (0.156*)	629-1.106
AVR	0.011-0.071	0.035-0.052 (0.132*)	0.496-0.840
S/MB	0.013-0.086	0.052-0.085 (0.124*)	0.767-1.119

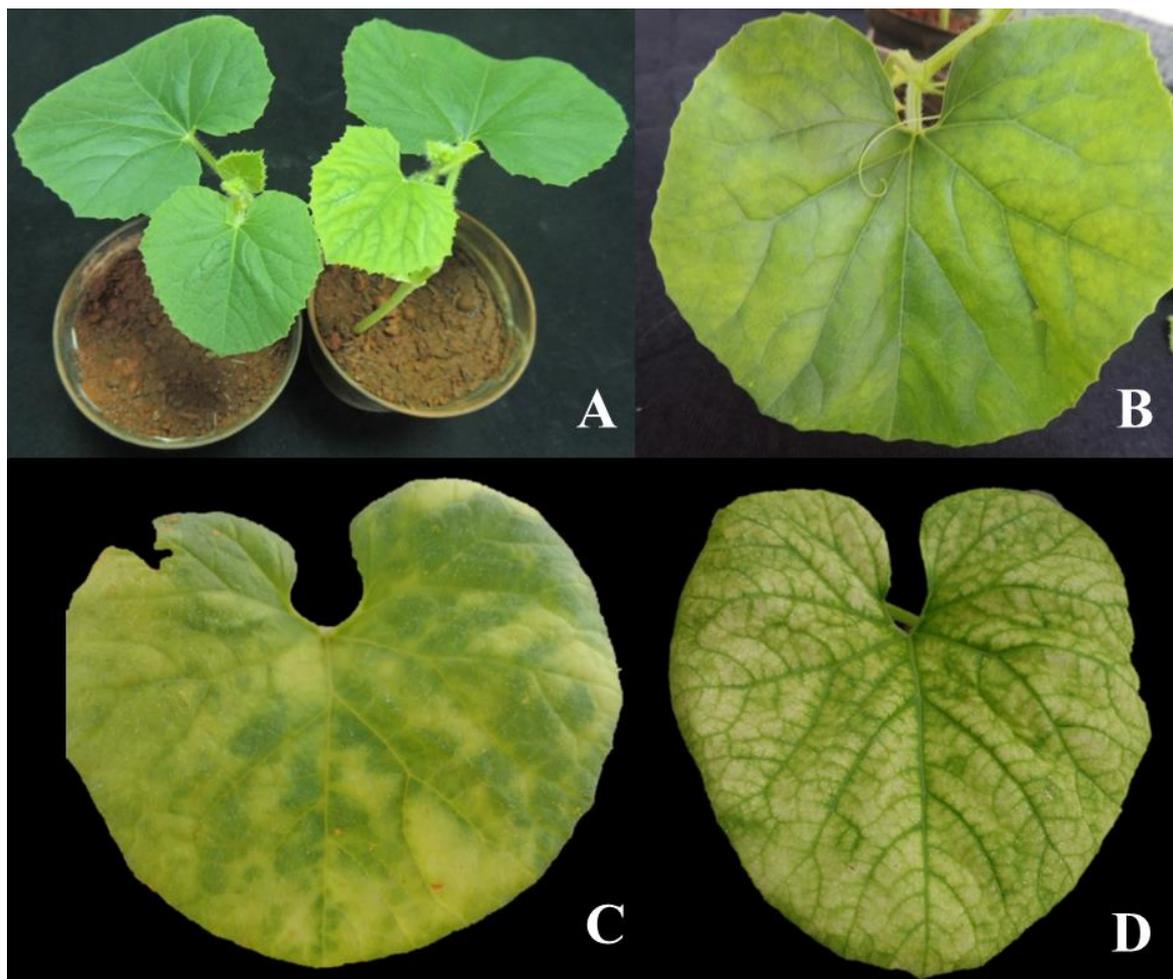
  

<b>3ª Repetição</b>			
	<b>Abs. amostras</b>	<b>Abs. cont -</b>	<b>Abs. cont +</b>
VIR	0.218-0.959	0.057-0.088 (0.121*)	0.823-0.911
AVR	0.020-0.060	0.052-0.073 (0.186*)	0.920-1.307
S/MB	0.013-0.098	0.055-0.081 (0.195*)	0.812-1.049

---

Controles negativos (plantas saudas); Controles positivos (plantas infectadas) VIR: meloeiros inoculados com o isolado brasileiro de CABYV; AVR: meloeiros confinados com moscas-brancas avirulíferas; S/MB: plantas de meloeiro que não receberam moscas brancas. \*: representa a média do controle negativo multiplicado por três.

A partir de 15 dias da inoculação, os meloeiros infectados apresentaram sintomas de clorose entre as nervuras (Fig. A) e ao longo do desenvolvimento da planta, os sintomas concentraram-se nas folhas mais velhas, posteriormente se distribuindo por toda a planta. As folhas mais velhas apresentaram inicialmente sintomas de clorose interneval em pequenas porções do limbo foliar até se alastrarem por toda a folha (Fig. 12).



**Figura 11.** Folhas de plantas infectadas com o CABYV brasileiro apresentando sintomas com 15 (A), 20 (B) e 30 (C) e mais de 30 (D) dias da inoculação.

### 3.4. DISCUSSÃO

Os polerovírus são vírus restritos ao floema e que apresentam certa dificuldade de purificação devido ao baixo título viral (Peter *et al.*, 2009). Para produção de antissoro policlonal do isolado brasileiro de CABYV foram necessárias quatro purificações de ~200 gramas de folhas para conseguir o total de 1,4 mg, que foi usado para a imunização do coelho. Foi possível produzir o antissoro sendo muito importante para a realização de testes de detecção, pela facilidade do teste e pelo baixo custo, se comparado a RT-PCR. O antissoro produzido poderá ser usado para trabalhos epidemiológicos dessa doença, que são muito importantes para avaliar a distribuição e incidência do vírus em meloeiro e em outras culturas

no país.

O CABYV é relatado em diferentes regiões do mundo, distribuído por países da Ásia, África, Europa e Estados Unidos (Shang *et al.*, 2009). Já foi primeiramente relatado na França (Lecoq *et al.*, 1992) e depois já foi relatado em outros países, como: Espanha (Juarez *et al.*, 2004), Itália (Tomassoli and Meneghini, 2007), Turquia (Yardimci & Özgönen, 2007), Egito (Omar & Bagdady, 2012), Arábia Saudita (Al-Saleh *et al.*, 2015), Irã (Bananej *et al.*, 2006), Coreia do Sul (Choi & Choi, 2015; Choi *et al.*, 2015), China (Xiang *et al.*, 2008), Japão (GQ221224) e EUA (GU002335). Há relatos de infecção de CABYV em cucurbitáceas como em melão, melancia, abobrinha e em bucha (Knierim *et al.*, 2010) e as plantas infectadas apresentam sintomas de amarelecimento e engrossamento das folhas mais velhas (Lecoq *et al.*, 1992). Os sintomas provocados pelo CABYV brasileiro são semelhantes aos descritos para outros isolados de CABYV. Inicialmente, os sintomas de amarelecimento intenso concentram-se nas folhas baixas e com mais de 25 dias de infecção se estendem para as folhas mais novas. Neste estudo, o CABYV foi detectado pela primeira vez no Brasil, sendo o primeiro relato desse vírus na América do Sul. Sugere-se que o CABYV brasileiro pode ter entrado no país através da introdução de moscas brancas virulíferas, que disseminou o vírus na região Nordeste. Como discutido no capítulo 1, estima-se que o CABYV pode ter sido introduzido no Brasil aproximadamente há 68 anos.

O CABYV é classificado no gênero *Polerovirus* dentro da família *Luteoviridae*. Todos os membros desta família conhecidos até o momento são transmitidos por afídeo de maneira persistente e não propagativa (Lecoq *et al.*, 1992; Knierim *et al.*, 2010; 2013; 2015; Ibaba *et al.*, 2016). No caso do potato leafroll virus (PLRV, espécie-tipo do gênero *Polerovirus*), a transmissão ocorre pelas espécies de afídeo *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* (revisado por Cilia *et al.*, 2011) da seguinte forma: o afídeo insere o estilete no floema da planta e suga a seiva contendo partículas virais. Em seguida, os virions atravessam o intestino médio e são

liberados para a cavidade do corpo do inseto (hemocele) para circular na hemolinfa. As partículas presentes na hemolinfa associam-se às glândulas salivares acessórias e posteriormente são transportadas pelo ducto do estilete para plantas hospedeiras (Yang *et al.*, 2008). Essa associação viral com insetos hospedeiros deve-se a interação com proteínas tipo GroEL (homólogas às de *Escherichia coli*) produzidas por endossimbiontes (Van Den Heuvel *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2008).

Este trabalho relata o primeiro polerovírus transmitido por moscas brancas (*B. tabaci*) em uma possível relação do tipo persistente. A hipótese inicial de que o isolado brasileiro CABYV é transmitido por mosca-branca foi previamente provada através do ensaio-piloto de transmissão, e em seguida foi definitivamente confirmada pelo ensaio de transmissão em condições controladas. Essa hipótese surgiu por se observar alta população de mosca branca em cultivo de meloeiro e baixa infestação de pulgões. Esta hipótese foi corroborada pela análise do genoma do CABYV brasileiro (caracterizado nesta dissertação, Cap 2) que apresenta um evento de recombinação na região 3' do seu genoma. Nesta região é codificada a proteína do capsídeo que é envolvida na interação com o inseto vetor, e, dessa forma, fortemente envolvida com a transmissão pelo vetor.

Eventos de recombinação no gênero polerovírus são muito frequentes entre duas ou mais espécies (Knierim *et al.*, 2010; 2013; 2015; Lecoq *et al.*, 1992). Há evidências de que esses eventos de recombinação têm acarretado a ampliação da gama de hospedeiros de alguns polerovírus (Dombrovsky *et al.*, 2010). A recombinação detectada no genoma do isolado brasileiro de CABYV envolve o isolado da França de CABYV como parental principal, sendo o parental menor ainda desconhecido. A região recombinante localiza-se na extremidade 3' do genoma do isolado brasileiro de CABYV que codifica a CP nas ORF3 e ORF5. É possível que o vírus parental desse fragmento seja transmitido por moscas-brancas e somente a identificação deste parental poderá auxiliar na elucidação desta questão.

Os carlavírus *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) e *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) são exemplos de vírus que são transmitidos por moscas brancas, enquanto a maioria das outras espécies do gênero *Carlavirus* é transmitida por afídeo (Tropics & Patancheru, 1983). Assim como o CPMMV e MYaV representam uma exceção por ter a mosca-branca como vetora dentro do gênero *Carlavirus*, o CABYV também representará a exceção para o gênero *Polerovirus*.

No campo, é observada alta infestação de moscas-brancas em plantas de meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão”. Na região de Mossoró (RN), em uma planta infestada pelo inseto e apresentando o sintoma típico de amarelão foi confirmada a infecção do CABYV brasileiro. O MYaV, um dos vírus associado à doença “Amarelão do meloeiro”, não foi detectado nessa planta, indicando que o CABYV brasileiro pode estar também associado à doença. Nessa mesma planta proveniente do campo de Mossoró, não foi detectado outros vírus que ocorrem em meloeiro no Nordeste (tais como CPMMV, Melon necrotic spot virus, MYaV, resultados não mostrados). Posteriormente, os sintomas em meloeiro infectado pelo isolado brasileiro de CABYV e propagados em condições de casa-de-vegetação demonstraram-se semelhantes ao do “Amarelão do meloeiro”, com forte clorose nas folhas mais velhas que após 30 dias de infecção se estende por toda a planta. Isto indica que o CABYV brasileiro é um forte candidato ao agente causal do “Amarelão do meloeiro”, a principal doença dessa cultura.

A partir deste trabalho sugere-se que o CABYV é associado à doença “Amarelão do meloeiro”. A incidência dessa doença é alta e é uma das principais fontes de preocupação dos produtores de melão do Rio Grande do Norte e Ceará, principais estados produtores desse fruto no Brasil. O manejo eficiente da doença ainda não foi estabelecido. Essa doença provoca redução no teor de açúcar (Brix) do fruto, causando grande prejuízo à sua comercialização, principalmente para o mercado exportador. A presença do CABYV foi confirmada no início

de 2017 em amostras de meloeiro da região Nordeste do Brasil (Cap. 1, em fase de publicação). O vírus, diferentemente dos demais polerovírus conhecidos, é transmitido por moscas-brancas, sendo que esse inseto representa a praga mais devastadora da atualidade não só no sistema agrícola brasileiro, mas também em todo o mundo.

A principal estratégia de controle de viroses é baseada no uso de plantas resistentes e, até o momento, não se conhecem variedades de meloeiro resistentes ao isolado brasileiro de CABYV. Portanto, a busca por fontes de resistência ao vírus é prioritária em programas de melhoramento de meloeiro. Entretanto, a caracterização do vírus também é essencial para se conhecer a doença e os fatores envolvidos com a sua incidência.

O CABYV é relatado sendo transmitido por afídeo das espécies *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* (Lecoq *et al.*, 1992). Desta forma, faz-se necessário avaliar se o isolado brasileiro de CABYV é transmitido por essas espécies de afídeo. Assim como é importante se conhecer o processo de transmissão do CABYV brasileiro pela moscas-brancas.

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil

# CAPÍTULO 4

---

---

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *Melon yellowing-associated virus*  
ISOLADO DE PLANTAS DE MELÃO COM SINTOMAS DE  
“AMARELÃO DO MELOEIRO” NO NORDESTE DO BRASIL**

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *Melon yellowing-associated virus* ISOLADO DE PLANTAS DE MELÃO COM SINTOMAS DE “AMARELÃO DO MELOEIRO” NO NORDESTE DO BRASIL**

**RESUMO EXPANDIDO**

O *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) é classificado no gênero *Carlavirus* (família *Betaflexiviridae*) e foi relatado pela vez na região Nordeste do Brasil em 2003. O vírus é transmitido por moscas-brancas e é amplamente disseminado nos principais polos produtores de melão do Nordeste. Até o presente trabalho, a sequência do genoma do MYaV não havia sido completamente elucidada. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar molecularmente o genoma do MYaV. Neste estudo, a sequência completa do genoma do isolado M22 de MYaV coletado em Mossoró (RN) foi determinada. Para isso, um *pool* composto por 22 amostras foliares de meloeiro apresentando sintomas de “Amarelão” foi submetido a Sequenciamento de Próxima Geração (NGS - *next generation sequencing*). Uma sequência consenso do MYaV foi gerada a partir de 8624 *reads*. Em seguida, foram desenhados *primers* baseados na sequência consenso para amplificar o genoma completo do MYaV para validação via sequenciamento pelo método Sanger. A sequência final é formada por 9073 nucleotídeos (acesso LC224308) codificando seis *open read frames* (ORFs), contendo uma cauda poli (A) na extremidade 3', em uma organização genômica típica de carlavírus. A ORF1 (ca. 6,2 kb) codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); A ORF2 (ca. 0,7 kb), ORF3 (ca. 0,3 kb) e ORF4 (ca.0,2 kb) codificam o bloco triplo de genes (TGB) 1, 2 e 3, respectivamente; ORF5 (ca. 1 kb) codifica a proteína da capa proteica (CP) e a ORF6 (ca. 0,4 kb) codifica a proteína de associação a ácidos nucleicos (NaBp). A análise filogenética utilizando o genoma completo e a proteína de replicação (RdRp) do MYaV confirmou que o MYaV pertence ao gênero carlavírus, com maior identidade de nucleotídeos com a sequência completa em nucleotídeo do genoma do Sweet potato yellow mottle virus

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil

(59.8%).

#### **4.1. MANUSCRITO PUBLICADO**

##### **Complete genome sequence of melon yellowing associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil**

Thiago M. Costa · Rosana Blawid · Avonor C. da Costa Junior · Mirtes F. Lima · Fernando A. S. de Aragão · Genira P. de Andrade · Gilvan Pio-Ribeiro · Miguel A. Aranda · Alice K. Inoue-Nagata · Tatsuya Nagata

#### **Abstract**

Here, we describe the complete genome sequence of melon yellowing-associated virus (MYaV), found in melon plants with severe yellowing disease, determined by high-throughput and Sanger sequencing. MYaV has an RNA genome of 9073 nucleotides plus a poly(A) tail. At least six open reading frames were predicted, with a typical carlavirus genomic organization. Phylogenetic analysis of the complete genome sequence and the amino acid sequences of the RNA-dependent RNA polymerase confirmed that MYaV belongs to the genus *Carlavirus*, with the highest genome-wide nucleotide sequence identity of 59.8% to sweet potato yellow mottle virus.

The Northeast region of Brazil produces most of the melons in the country, in an area corresponding to ~25,000 hectares. Since 1997, a severe yellowing disease was reported devastating melon crops, which is associated with a virus that is transmitted by whiteflies (King *et al.*, 2012; Muniyappa & Reddy, 1983; Nagata *et al.*, 2003).

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil

Here, the complete genome sequence of melon yellowing-associated virus (MYaV) was determined as a first step towards determining the etiology and the biological characteristics of this severe yellowing disease. We used high-throughput sequencing (HTS) and Sanger sequencing to assemble the complete genome sequence of MYaV. Initially, leaf samples of 22 melon plants with severe yellowing symptoms were collected in 2015 in Mossoró county, Rio Grande do Norte (RN) State, in the Northeast region of Brazil. HTS was performed according to Blawid *et al.* (2017) to assemble a near-complete genome of 8993 nt with 8624 reads. To validate the HTS results, the MYaV complete genome sequence was determined by Sanger sequencing using cDNA from a single melon plant (M22 isolate). Five overlapping PCR products along the genome (primers described in Table 1) were sequenced directly. The sequence of the 5' end of the genome was determined using the 5'-RACE (System for Rapid Amplification of cDNA Ends) protocol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), using two specific primers (GSP1 and GSP2, Table 1). We determined the 3' end sequence by 3'-RACE as described by Rabelo Filho *et al.* (2013). All sequencing reactions were performed by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

The HTS draft genome sequence (from a pool of samples) shared 98.5% nt sequence identity with the complete MYaV-M22 genome of 9073 nt (accession LC224308) plus the 3' poly(A) tail. Six open reading frames (ORFs) were predicted in a genome organization typical of members of the genus *Carlavirus*, with short untranslated regions at the 5' and 3' ends. ORF1 encodes an RdRp, which is essential for viral replication; ORF2, ORF3, and ORF4 encode TGB1, TGB2, and TGB3, respectively; ORF5 encodes the coat protein (CP); and ORF6 encodes a nucleotide-binding protein (NaBp) (Fig. 2A). The predicted RdRp protein contained conserved domains, including methyltransferase, 2OG-Fe(II) oxygenase, peptidase C23 of the carlavirus endopeptidase family, viral helicase, and RdRp family domains (Fig. 2A).

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil

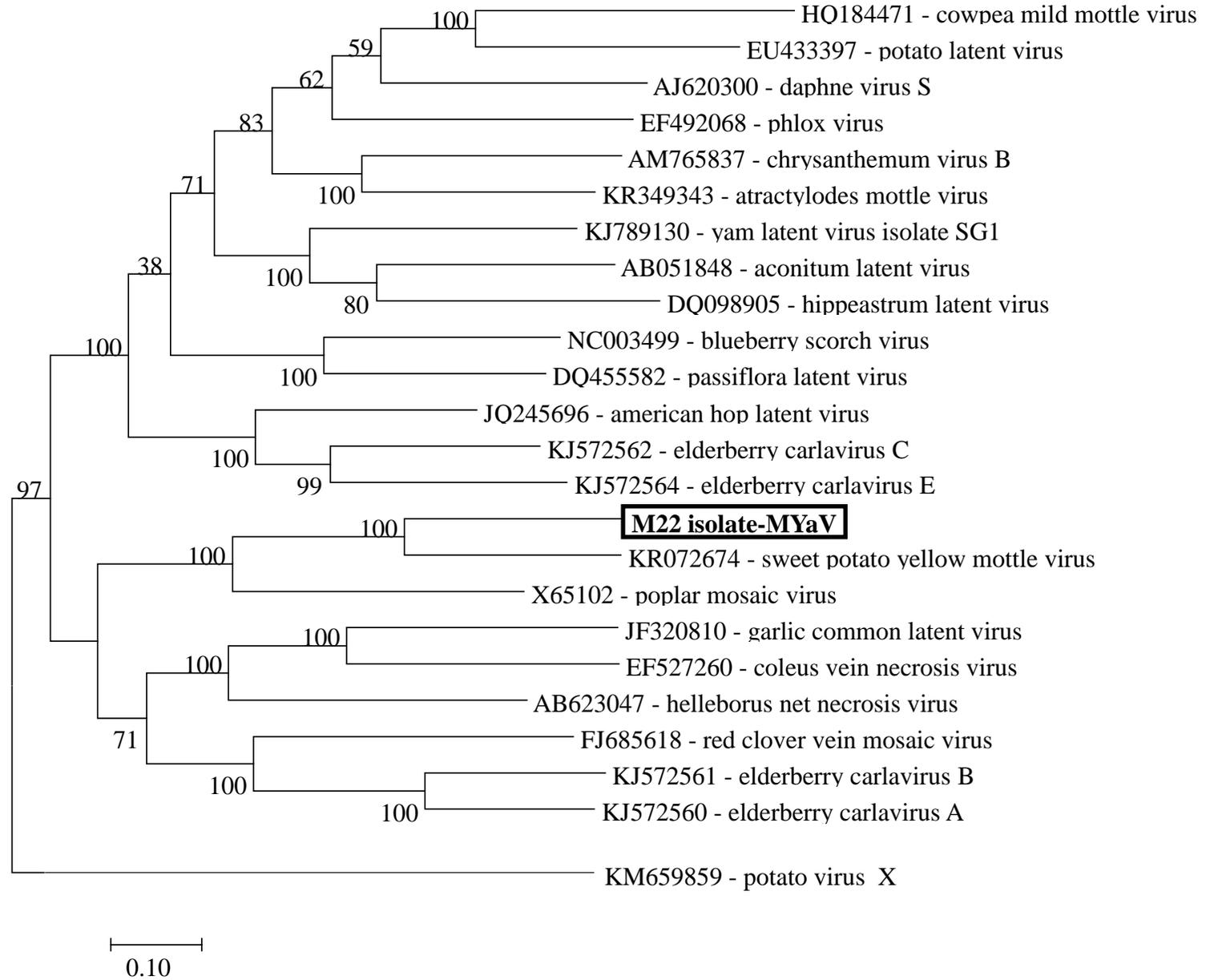
Maximum-likelihood analysis was used to construct phylogenetic trees of MYaV-M22 and carlaviruses using MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). The phylogenetic tree generated from the complete nucleotide sequence (Fig. 1A) and the amino acid (aa) sequences of RdRp (Fig. 1B) indicated that the MYaV- M22 isolate was most closely related to sweet potato yellow mottle virus (KR072674) (Fig. 1A) with a pairwise genome-wide nt sequence identity of 59.8% (determined by SDT; Muhire *et al.*, 2014). Carlaviruses must have <72% nt sequence identity (or 80% aa sequence identity) in their CP or RdRp genes to be considered members of distinct species (King *et al.*, 2012). Finally, no evidence of significant recombination was found (data not shown) when the genome sequence was analyzed by RDP4 (Martin *et al.*, 2015).

The aa sequences of the TGBs of the MYaV-M22 isolate (this study) and the homologous sequences of a previously reported isolate (Nagata *et al.*, 2010) differed, with 90.6% aa sequence identity for TGB1, 94.5% for TGB2, and 92.5% for TGB3. The CP aa sequence of these isolates shares 97.5 % identity; and that of NaBp, 94.8% identity. The previously reported virus sequence was based on the isolate collected in 2003 (Bessa isolate), although the sampling region is the same (Mossoró county). These differences in genomic sequences suggest fast diversification during this time span, although our HTS analysis did not reveal wide genetic diversity in the pooled sample from 2015 (data not shown).

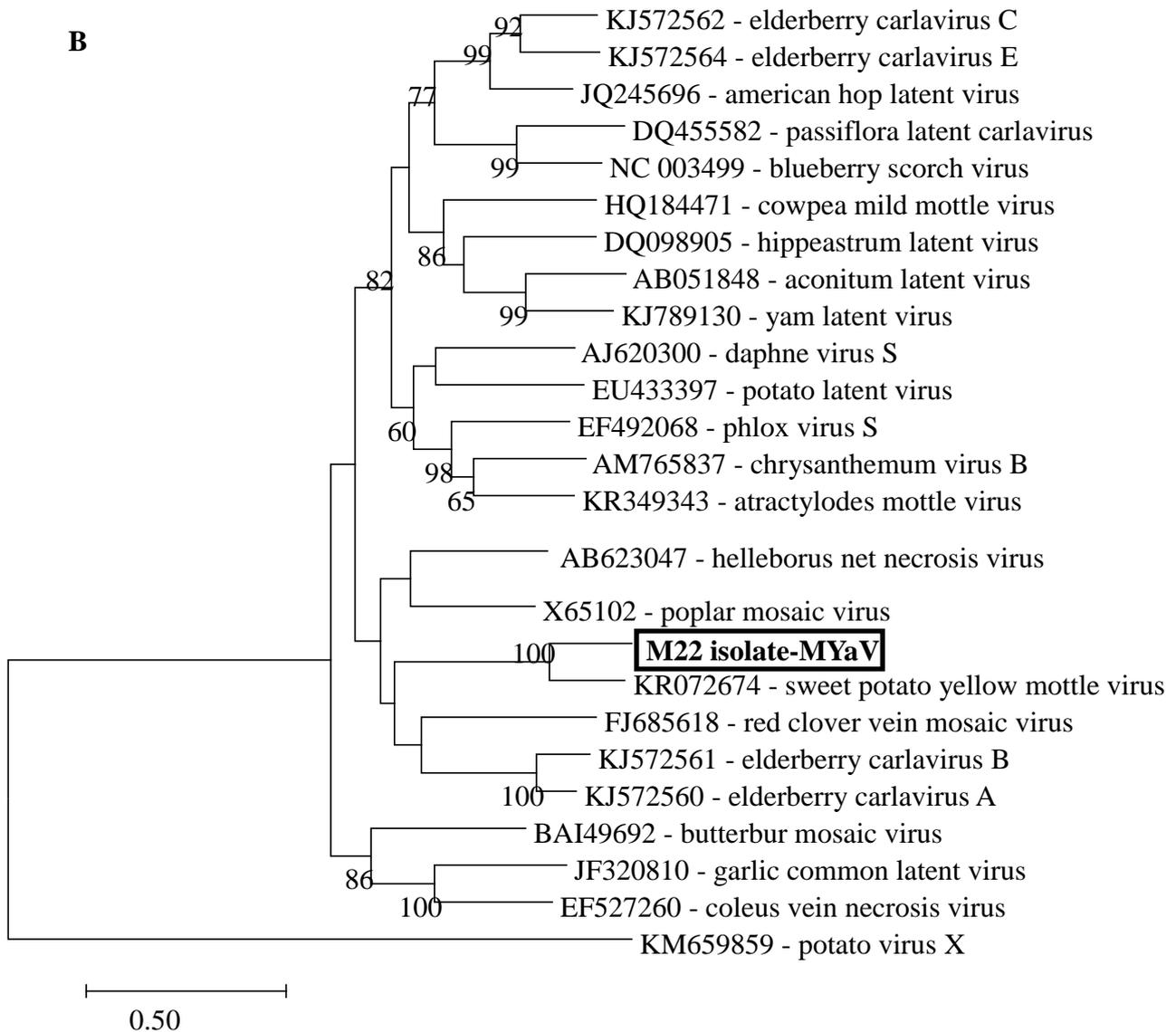
Based on the criteria for carlavirus classification, the sequence analysis of the complete genome and of the RdRp suggested that melon yellowing-associated virus should be considered a member of a distinct species within the genus *Carlavirus*.

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil

**Figures**

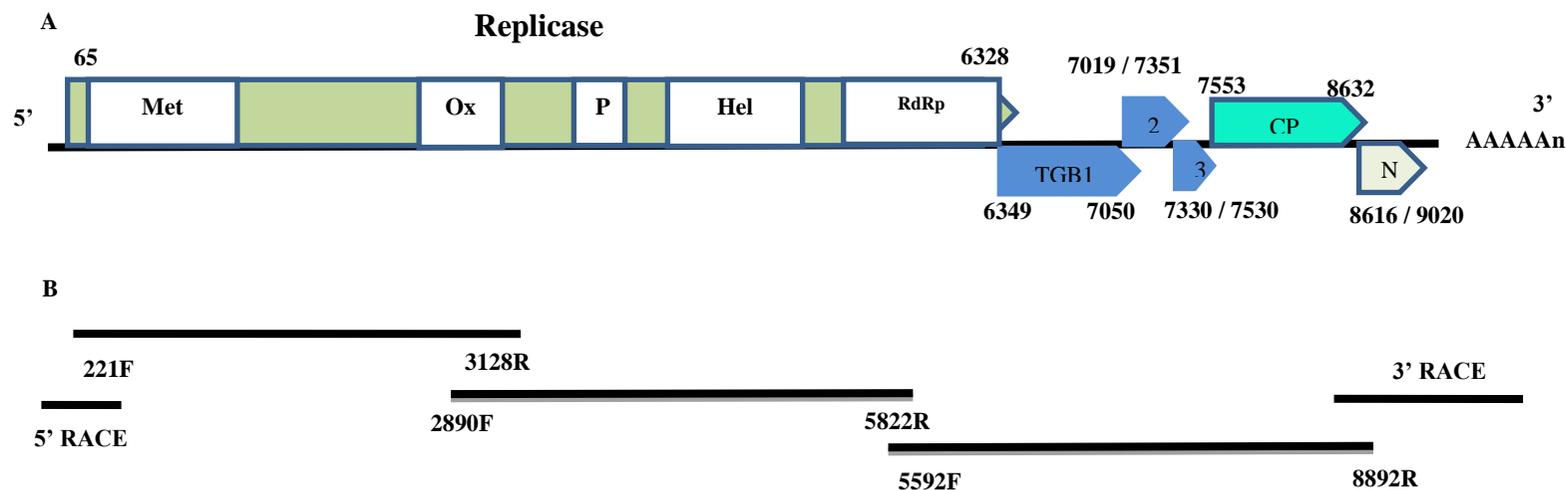


Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil



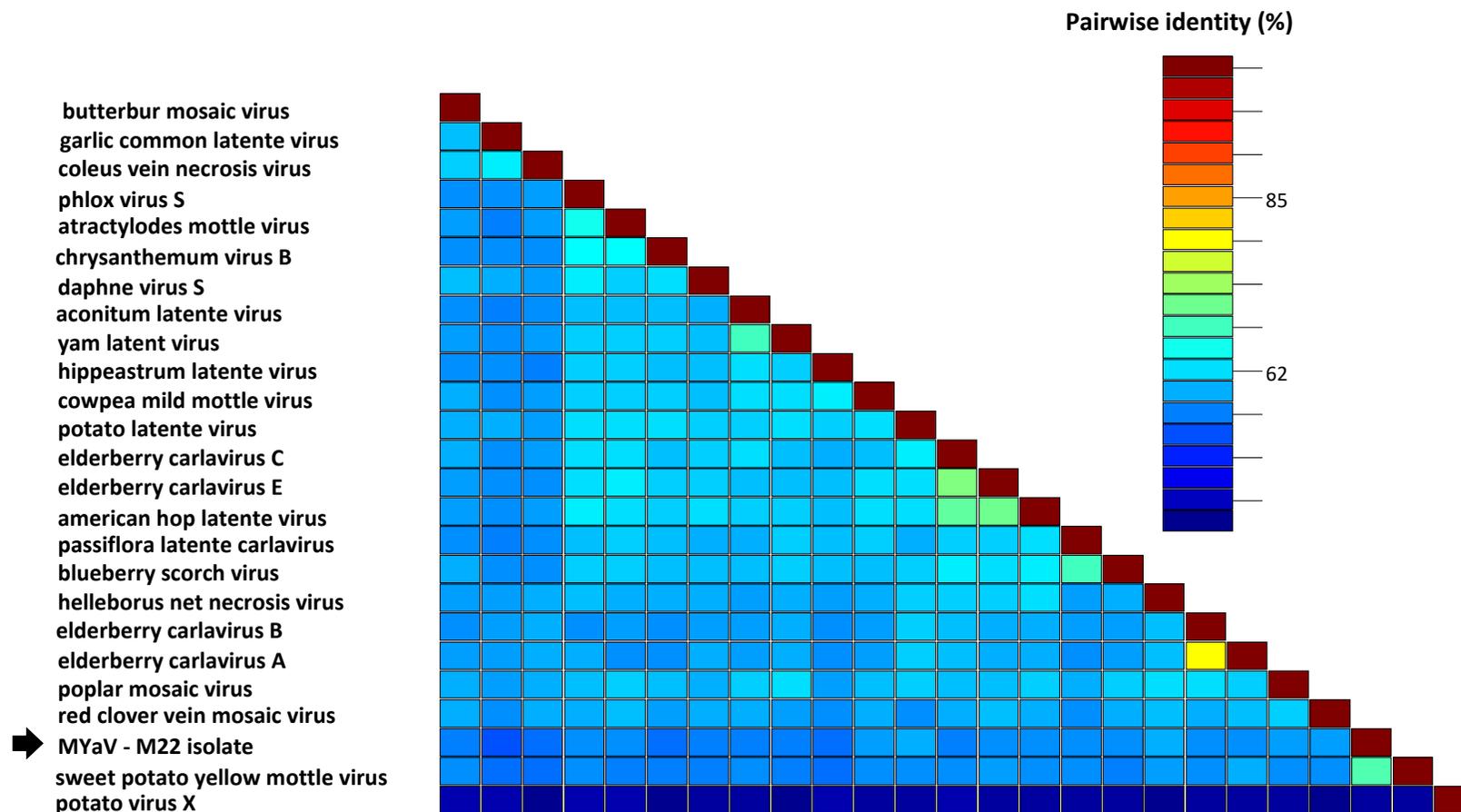
**Figura 1.** Phylogenetic trees based on the nucleotide sequence of the complete genome (A) and amino acid sequence of RdRp (B) of MYaV and related carlaviruses and the amino acid sequence pairwise comparison matrix. Potato virus X was used as an outgroup. Bootstrap values (1500 repetitions) and the accession number of each sequence are indicated. Bar: number of substitutions per site.

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil



**Figure 2.** Schematic representation of the genome organization and amplification by RT-PCR. **A.** Organization, identification, and size of the ORFs in the MYaV-M22 genome of 9037 nucleotides. 2, TGB2; 3, TGB3; NaBp, nucleic acid binding protein; Met, methyltransferase; Ox, 2OG-Fe(II) oxygenase; P, peptidase\_C23; Hel, helicase, and RdRp, RNA-dependent RNA polymerase. **B.** Position of the primers in the genome used for cDNA amplification by RT-PCR covering the genome for Sanger sequencing.

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil



**Figure 3.** Matrix generated by Sequence Demarcation Tool Version 1.2 (SDTv1.2) comparing the amino acid sequences of RdRp of MYaV and related carlavirus species.

Este capítulo foi publicado na revista Archives of Virology (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil

**Table 1.** Primer sequences used for cDNA amplification of the genome by RT-PCR and RACE protocols.

Primer	Sequence
5' RACE	
GSP 1	AGG CTC CAA TAA TGA ATC TCG TC
GSP 2	TGC CCT CCA ACT AAA ATA CCG
5' region	
221F	CAT GCA AAA GAA CGC TTG ACT AAA G
3128R	GGA TTT CAT TCT GAG CCT TGA TGT C
Middle region	
2890F	TTC TGA CGA TGA AAT TGC TTT CGA A
5822R	ACC CCA GGT GTG TTT TGA TAT AC
3' region	
5592F	ACG AGG TGT TAC CCG ATA AAT TC
8892R	CGT TTA TTT GAG AAC TTG TAT TCG GC
3' RACE	
8435F	ACC AAT CAC TCT GCC ATG AAA C
M4	TCA GCA CTG ACC CTT TTG

## 4.2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o genoma completo do MYaV foi sequenciado pela primeira vez. Outros dois isolados desse vírus já apresentam o genoma parcialmente sequenciado, os isolados de 2003 (Nagata *et al.*, 2003) e 2005 (Nagata *et al.*, 2005). Com este trabalho, foi possível completar a sequência do genoma do vírus de um isolado coletado em 2015 em Mossoró (RN), com a determinação da sequência da polimerase viral (RdRp). O isolado M22 deste trabalho possui o genoma de 9073 nucleotídeos (acesso LC224308), codificando cinco ORFs. Para ser considerada uma espécie distinta dentro do gênero carlavírus, um vírus precisa apresentar porcentagem de identidade entre a proteína da CP ou RdRp inferior a 72% (ou

Este capítulo foi publicado na revista *Archives of Virology* (Sessão Annotated Sequence Record, fator de impacto 2,058) com o título Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil

80% em aminoácidos). A RdRp do isolado M22 deste trabalho apresentou maior porcentagem de identidade de 59,8% com a espécie tentativa do carlavírus Sweet potato yellow mottle virus (SPYMV) e com um carlavírus aceito pelo ICTV mais próximo apresentou 42,9% com a espécie *Poplar mosaic virus* (PMV). A análise filogenética a partir da sequência em nucleotídeo do genoma completo e da sequência em aminoácido da RdRp do isolado M22 mostrou que o MYaV apresenta maior relação com o SPYMV (KR072674) e com o PMV (X65102), confirmando o melon yellowing-associated virus como uma nova espécie do gênero carlavírus. Não foi detectado nenhum evento de recombinação no genoma do MYaV.

O resultado deste trabalho possibilitou também o desenvolvimento de *primers* específicos (Table 1) a serem utilizados como uma nova ferramenta de detecção a nível molecular do MYaV, o que facilitará a sua detecção a partir de amostras de campo em estudos de ocorrência ou incidência desse vírus em estudos futuros.

Os resultados deste capítulo constituem a caracterização molecular completa do genoma do MYaV, com relação ao tamanho do genoma, assim como a identificação e caracterização das ORFs e suas respectivas proteínas codificadas.

**Acknowledgements** This work was supported by CAPES/Brazil for TMC and the program Ciência sem Fronteiras (CNPq/Brazil) for MAA

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS DA DISSERTAÇÃO

---

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS DA DISSERTAÇÃO

A cultura do meloeiro é importante economicamente para o país, pois boa parte da produção nacional é destinada ao comércio exterior, sendo o fruto mais exportado do país. A cultura é muito importante para a região Nordeste, principalmente para o Rio Grande do Norte e Ceará, sendo fonte de emprego para muitos moradores da região que trabalham diretamente na produção do fruto. Produtores reclamam da principal doença do meloeiro, “Amarelão do meloeiro”, e da alta infestação de moscas-brancas na cultura ao longo do plantio, resultando na redução na qualidade do fruto, o que tem prejudicado a sua comercialização. Existe uma forte demanda de pesquisas voltadas para o controle do “Amarelão do Meloeiro”, que precisam ser necessariamente iniciadas com a determinação definitiva do agente etiológico da doença.

A detecção de um isolado de CABYV não era esperada. O emprego do NGS neste estudo comprova que essa tecnologia foi eficaz para a detecção de vírus, que não seria possível (ou ser difícil de realizar) com o uso das ferramentas tradicionais de virologia. Com a caracterização do MYaV e CABYV neste estudo, foi possível compreender melhor a doença do amarelão e listar com maior precisão os possíveis candidatos a agente etiológico dessa doença. O MYaV era considerado como o principal candidato a agente etiológico da doença, porém, com a detecção e caracterização do CABYV em meloeiro, o agente etiológico dessa doença permanece indefinido porque o CABYV em infecção simples provoca sintomas típicos do amarelão, como foi comprovado em inoculações artificiais. Deste modo, levanta-se a hipótese desse poliovírus ser um forte candidato ao agente causal da doença. Para confirmar isso, faz-se necessário avaliar a sintomatologia causada por esses vírus (MYaV e CABYV) em infecção simples e mista. Para realizar estes estudos, a estratégia de produção de clones infecciosos a partir do genoma completo do MYaV e CABYV é atraente, pois evita a

etapa de inoculações com moscas-brancas, que é muito complexa em um ambiente tropical como do Brasil, onde existem moscas-brancas em todos os locais. Desta forma, o agente etiológico do amarelão poderá elucidado definitivamente.

Interessantemente, foi descoberto que o isolado de CABYV é transmitido por moscas-brancas, sendo o primeiro caso de um vírus transmitido por moscas-brancas dentro da família *Luteoviridae*. Sugere-se que isso pode ter ocorrido devido ao evento de recombinação na região da capa proteica desse vírus, alterando a especificidade do vetor. Para confirmar a incapacidade de transmissão do CABYV brasileiro por afídeos, ensaios de transmissão com a espécie *Aphis gossypii* estão sendo realizados.

O isolado brasileiro recombinante de CABYV tem como *major parent* um isolado de CABYV da França. A falha na identificação do *minor parent* do CABYV brasileiro na análise de recombinação demonstra que é necessário realizar expedições de coleta e identificação de vírus na região, particularmente em outras plantas, para se buscar pelo vírus doador do fragmento de genoma recombinante. Será um estudo muito interessante e desafiador. O antissor de CABYV pode facilitar em muito a detecção deste vírus parental, assim como, ser ferramenta primordial para a realização de estudos epidemiológicos. Há urgência em se determinar o agente causal do amarelão do meloeiro, sua distribuição, a diversidade viral e a resposta de plantas cultivadas e daninhas à infecção pelo vírus. Esses dados são necessários para viabilizar um programa de controle eficiente da doença.

# **CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO**

---

---

## CONCLUSÕES GERAIS DO DISSERTAÇÃO

- O genoma do MYaV tem 9073 bases e possui a organização genômica e relacionamento filogenético típicos de carlavírus.
- O genoma dos dois isolados brasileiros de CABYV possui cerca de 5,7 Kbases e possui a organização genômica e relacionamento filogenético típicos de polerovírus.
- O isolado brasileiro de polerovírus identificado em meloeiro com sintomas de amarelão é um recombinante entre o CABYV e outro polerovírus desconhecido. De acordo com os critérios taxonômicos, esse vírus deve ser classificado como um membro da espécie *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, no gênero *Polerovirus*.
- A tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) é muito útil para descobrir novos vírus e para detecção. As sequências virais obtidas por NGS são compatíveis com as sequências geradas a partir do sequenciamento convencional por Sanger.
- As partículas purificadas do isolado brasileiro de CABYV foram imunogênicas e o antissoro produzido contra a CP desse vírus está disponível para a realização de trabalhos de epidemiologia.
- O CABYV recombinante detectado em meloeiro no Brasil é transmitido por moscas-brancas de meloeiro para meloeiro.
- O MYAV e o CABYV são os dois potenciais agentes etiológicos do “Amarelão do meloeiro”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- ADAMS, M. J.; KING, A. M. Q.; CARSTENS, E. B. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of virology* 158(9), 2023-2030.
- ADAMS, M. J.; LEFKOWITZ, E. J.; KING, A. M. Q.; CARSTENS, E. B. 2014. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014). *Archives of virology*, 159,10: 2831-2841.
- ALMEIDA, A. M. R. 2008. Viroses da soja no Brasil: sintomas, etiologia e controle. Embrapa Soja-Documents. *INFOTECA-E*.
- ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; VALENTIN, N.; BENATO, L. C.; MARIN, S. R. R.; BINCECK, E.; OLIVEIRA, T. G.; BELINTANI, P.; GUERZONI, R. A.; NUNES Jr, J.; HOFFMANN, L.; NORA, P. S.; NEPOMUCENO, A. L.; MEYER, M. C.; ALMEIDA, L. A. 2003. Necrose da haste da soja. Embrapa Soja-Documents. *INFOTECA-E*.
- ALMEIDA, Á. M.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; OLIVEIRA, T. G. D.; MORAES, T. G. D. 2005. Detection and partial characterization of a carlavirus causing stem necrosis of soybean in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 30: 191-194.
- AL-SALEH, M.A., AL-SHAHWAN, I.M., AMER, M.A., SHAKEEL, M.T., ALI, K., CHRISTOS, X., ORFANIDOU, C., KATIS, N. 2015. First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in cucurbit crops in Saudi Arabia. *Plant Dis.* 99, 894
- ANCELOTTI, F., & COSTA, N. D. 2010. Sistema de produção de melão. *Petrolina: Embrapa Semiárido*.
- ÁVILA, A., & REIS, A. 2007. Doenças do meloeiro (Cucumis melo) causadas por vírus. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica. *INFOTECA-E*.
- AQUINO, J. R. & FREIRE, J. A. 2017. A dinâmica da produção de melão no RN. *O Mossoroense* p. 11.
- BANANEJ, K., DESBIEZ, C., WIPF-SCHEIBEL, C., VAHDAT, I., KHEY-POUR, A., AHOONMANESH, A., LECOQ, H. 2006. First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Iran causing yellows on four cucurbit crops. *Plant Dis.* 90, 526.
- BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A.A., DVORKIN, M., KULIKOV, A.S., LESIN, V.M., NIKOLENKO, S.I., PHAM, S., PRJIBELSKI, A.D., PYSHKIN, A.V., SIROTKIN, A.V., VYAHHI, N., TESLER, G., ALEKSEYEV, M.A., PEVZNER, P.A. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comp. Bio.* 19, 455-477.
- BARBA, M; CZOSNEK, H; HADIDI, A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6: 106-36.
- BARBOSA, G. D. S.; LIMA, J. A. D. A.; QUEIRÓZ, M. A. D.; DIAS, R. D. C. S.; LIMA, C. S. 2016. Identification and effects of mixed Infection of Potyvirus isolates with Cucumber mosaic virus in cucurbits. *Revista Caatinga* 29: 1028-1035.
- BATESON, M. F.; HENDERSON, J.; CHALEEPROM, W.; GIBBS, A. J.; DALE, J. L. 1994. Papaya ringspot potyvirus: isolate variability and the origin of PRSV type P (Australia). *Journal of General Virology* 75: 3547-3553.
- BIELEJEC, F., RAMBAUT, A., SUCHARD, M.A., LEMEY, P. 2011. SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics.* 27, 2910–2912.
- BLAWID, R., SILVA, J.M.F., NAGATA, T., 2017. Discovering and sequencing new plant

- viral genomes by next-generation sequencing: Description of a practical pipeline. *Ann. Appl. Biol.* 170, 301-314.
- BOLGER, A.M., LOHSE, M., USADEL, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30, 2114-2120.
- BRAGA, M. B.; MAROUELLI, W. A.; RESENDE, G. M.; MOURA, M. S.; COSTA, N. D.; CALGARO, M.; CORREIA, J. S. 2017. Soil covers on the melon cultivation under nonwoven blanket. *Horticultura Brasileira* 35: 147-153.
- BRUNT, A. A., & KENTEN, R. H. 1974. Cowpea mild mottle virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, 140.
- CARSTENS, E. B. 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Archives of virology*, 155(1): 133-146.
- CEPEA. 2016. Centro de Estudos Avançados em Economia. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/br>>. Consultado em: 15 de agosto de 2017.
- CHEEWACHAIWIT, S.; WARIN, N.; PHUANGRAT, B.; RUKPRATANPORN, S.; GAJANANDANA, O.; BALATERO, C. H.; CHATCHAWANKANPHANICH, O. 2017. Incidence and molecular diversity of poleroviruses infecting cucurbit crops and weed plants in Thailand. *Archives of Virology* 1-8.
- CILIA, M.; TAMBORINDEGUY, C.; FISH, T.; HOWE, K.; THANNHAUSER, T. W.; & GRAY, S. 2011. Genetics coupled to quantitative intact proteomics links heritable aphid and endosymbiont protein expression to circulative polerovirus transmission. *Journal of virology* 85: 2148-2166.
- CHITARRA, M. I. F. & CHITARRA, A. B. 2005. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras, UFLA 783p.
- CHOI, S.K., CHOI, G.S. 2015. First Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Cucumis melo in Korea. *Plant Dis.* 100, 234.
- CHOI, S. K.; YOON, J. Y.; CHOI, G. S. 2015. Biological and Molecular Characterization of a Korean Isolate of Cucurbit aphid-borne yellows virus Infecting Cucumis Species in Korea. *The plant pathology journal* 31: 371.
- COSTA, A. S.; GASPARGAR, J. O.; VEGA, J. 1983. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um carlavírus transmitido pela mosca branca Bemisia tabaci. *Fitopatologia brasileira* 8: 325-337.
- COSTA, J. D. A. 2016. Desempenho agrônomico e reação de genótipos quanto a viroses do meloeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Feira de Santana, Bahia.
- CSORBA T., LÓZSA R., HUTVÁGNER G., BURGYN J. 2010. Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J.* 62, 463–472.
- CUPERTINO, F. P.; KITAJIMA, E. W.; FONSECA, M. E. N.; MEYER, N. 1988. Viroses em plantas olerícolas no Estado de Goiás. *Fitopatologia Brasileira* 13: 101.
- D'ARCY, C. J.; DOMIER, L. L.; MAYO, M. A. 2000. Family luteoviridae. *MHV van Regenmortel, CM Fauquest*.
- DELAPLANE, K.S. & MAYER, D.F. 2005. Crop pollination by bee. Oxon: CABI Publishing, 344p.
- DENG, X. G.; PENG, X. J.; ZHU, F.; CHEN, Y. J.; ZHU, T.; QIN, S. B.; LIN, H. H. 2015. A critical domain of Sweet potato chlorotic fleck virus nucleotide-binding protein (NaBp) for RNA silencing suppression, nuclear localization and viral pathogenesis. *Molecular plant pathology* 16: 365-375.
- DOMBROVSKY, A., GLANZ, E., PEARLSMAN, M., LACHMAN, O., & ANTIGNUS, Y. 2010. Characterization of Pepper yellow leaf curl virus, a tentative new Polerovirus species causing a yellowing disease of
- DOMIER, L. L., MCCOPPIN, N. K., LARSEN, R. C., & D'ARCY, C. J. 2002. Nucleotide

- sequence shows that Bean leafroll virus has a Luteovirus-like genome organization. *Journal of General Virology*, 83(7): 1791-1798.
- DRUMMOND, A.J., SUCHARD, M.A., XIE, D., RAMBAUT, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969- 1973.
- FAOSTAT/FAO. 2014. Divisão de Estatística da FAO/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Consultado em 15 de agosto de 2017. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- FARIA, C. M. B. & PEREIRA, J. 1982. Ocorrência do amarelão no meloeiro e seu controle. *EMBRAPA-CPATSA*. Comunicado Técnico.
- FAJARDO, T. V.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; ÁVILA, A. C.; RESENDE, R. O. 2001. Garlic viral complex: identification of potyviruses and carlavirus in central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 26: 619-626.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALI, L. A. A. 2005. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
- FILGUEIRA, F.A.R. 2008. Novo Manual de olericultura. Viçosa, UFV, p. 402.
- FONTES, P.C.R. & PUIATTI, M. 2005. Cultura do melão. In: FONTES, P. C. R. Olericultura: teoria e prática. Viçosa–MG: UFV, cap.26. p. 407-428.
- FRANCKI, R. I.; MOSSOP, D. W.; HATTA, T. 1979. Cucumber mosaic virus. *CMI/AAB descriptions of plant viruses* 213: 6.
- GASPAR, J. O.; BELINTANI, P.; ALMEIDA, A. M. R.; KITAJIMA, E. W. 2008. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. *Journal of virological methods* 148: 283-285.
- GIAMPAN, J. S.; REZENDE, J. A. M.; SILVA, R. F. 2007. Reaction of cucurbits species to infection with Zucchini lethal chlorosis virus. *Scientia horticultrae* 114: 129-132.
- GONSALVES, D; PLOETZ, G. A.; ZENTMYER, W. T.; NISHIJIMA, K. G.; ROHRBACK, D. H. 1994. Papaya ringspot virus. in: *Compendium of Tropical Fruit Disease*. Ohr, eds. Academic Press, New York, 67-68.
- GRAY, S. & GILDOW, F. E. 2003 Luteovirus-aphid interactions. *Annu. Rev. Phytopathology* 41: 539–566.
- GUILLEY, H., WIPF-SCHEIBEL, C., RICHARDS, K., LECOQ, H., JONARD, G. 1994. Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology*. 202, 1012-1017.
- GUIU-ARAGONÉS, C.; DÍAZ-PENDÓN, J. A.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. M. 2015. Four sequence positions of the movement protein of Cucumber mosaic virus determine the virulence against cmv1-mediated resistance in melon. *Molecular plant pathology* 16: 675-684.
- HAUSER, M.; STEVENS, C.; MOUGEL, H. G.; SMITH, C.; FRITSCH, E.; HERRBACH, O. 2000. Biological, serological, and molecular variability suggest three distinct polerovirus species infecting beet or rape. *Phytopathology* 90: 460–466.
- HUANG L.F., NAYLOR, M., PALLETT, D.W., REEVES, J., COOPER, J.I., WANG, H. 2005. The complete genome sequence, organization and affinities of carrot read leaf virus. *Arch. Virol.* 150, 1845-1855.
- IBABA, J. D.; LAING, M. D.; GUBBA, A. 2017. Pepo aphid-borne yellows virus: a new species in the genus Polerovirus. *Virus genes* 53: 134-136.
- IBGE. 2016. Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia – Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estados/>>. Consultado em: 14 de agosto de 2017.
- INOUE-NAGATA, A.K.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L. 2016. A review of geminivirus

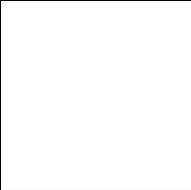
- (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira* 34: 008-18.
- ICTV. 2016. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>. Acessado em: 22/08/2017.
- JAAG, H. M.; KAWCHUK, L.; ROHDE, W.; FISCHER, R.; EMANS, N.; PRÜFER, D. 2003. An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 8939-8944.
- JEEVALATHA, A., KAUNDAL, P., SHANDIL, R. K., SHARMA, N. N., CHAKRABARTI, S. K., & SINGH, B. P. 2013. Complete genome sequence of potato leafroll virus isolates infecting potato in the different geographical areas of India shows low level genetic diversity. *Indian Journal of Virology*, 24(2): 199-204.
- JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, E. S., BOSQUE-PÉREZ, N. A., BERGER, P. H., & ZEMETRA, R. S. 2004. Life history of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae), on transgenic and untransformed wheat challenged with Barley yellow dwarf virus. *Journal of economic entomology*, 97(2): 203-212.
- pepper. *Phytoparasitica*, 38, 5: 477-486.
- JUAREZ, M; TRUNIGER, V; & ARANDA, M. A. 2004. First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Spain. *Plant Disease*, 88, 8: 907-907.
- KAO, J.; JIA, L.; TIAN, T.; RUBIO, L.; FALK, B. W. 2000. First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus (genus *Crinivirus*) in North America. *Plant Disease* 84: 101-101.
- KASSEM, M. A.; JUAREZ, M.; GÓMEZ, P.; MENGUAL, C. M.; SEMPERE, R. N.; PLAZA, M.; ARANDA, M. A. 2013. Genetic diversity and potential vectors and reservoirs of Cucurbit aphid-borne yellows virus in southeastern Spain. *Phytopathology* 103: 1188-1197.
- KASSEM, M.A., SEMPERE, R.N., JUAREZ, M., ARANDA, M.A., TRUNIGER, V. 2007. Cucurbit aphid-borne yellows virus is prevalent in field-grown cucurbit crops of southeastern Spain. *Plant Dis.* 91, 232–238.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics applications note*, v. 28, n. 12, p, 1647- 1649.
- KESHAVARZ, T.; SHAMS-BAKHS, M.; IZADPANAH, K.; MALBOOBI, M. A. 2014. Occurrence and genome analysis of Cucurbit chlorotic yellows virus in Iran. *Journal of Phytopathology* 162: 523-526.
- KNIERIM, D.; DENG, T. C.; TSAI, W. S.; GREEN, S. K.; KENYON, L. 2010. Molecular identification of three distinct Polerovirus species and a recombinant Cucurbit aphid-borne yellows virus strain infecting cucurbit crops in Taiwan. *Plant pathology* 59: 991-1002.
- KNIERIM, D., MAISS, E., KENYON, L., WINTER, S., MENZEL, W. 2015. First full-length genome sequence of the polerovirus luffa aphid-borne yellows virus (LABYV) reveals the presence of at least two consensus sequences in an isolate from Thailand. *Arch. Virol.* 160, 2633-2636.
- KNIERIM, D.; TSAI, W. S.; KENYON, L. 2013. Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described pepper vein yellows virus (genus *Polerovirus*) in six additional countries. *Archives of virology* 158: 1337-1341.
- KING, A. M.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFCOWITS, E. J. 2012. Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

- London: *Elsevier Academic Press* p.1327.
- KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Bio. Evol.* 33, 1870-1874.
- KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. 2005. Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas, 4. ed., Agronômica Ceres. São Paulo. v. 2, p. 293-310.
- LAWRENCE, D. M., ROZANOV, M. N., & HILLMAN, B. I. 1995. Autocatalytic processing of the 223-kDa protein of blueberry scorch carlavirus by a papain-like proteinase. *Virology*, 207(1): 127-135.
- LEMAIRE, O. J.; GUBLER, W. D.; VALENCIA, J.; LECOQ, H. & FALK, B. W. 1993. First report of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus in the United States. *Plant Disease*, 77(11).
- LECOQ, H. 2003. Cucurbits. In *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries*. Springer Netherlands p. 665-688.
- LECOQ, H., BOURDIN, D., WIPF-SCHEIBEL, C. 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellow virus. *Plant Pathol.* 41, 749-761.
- LIMA, J. A. A. & GOMES, M. N. S. 1975. Identificação de “papaya ringspot virus” no ceará. *Fitossanidade* 1:56-59.
- LIMA, M.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A. K.; AVILA, A. 2008. O 'Amarelão' do melão: incidência e epidemiologia em áreas produtivas da região Nordeste. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- LIMA, M. F. 2011. Víruses de cucurbitáceas. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- LIMA, J.A.A. 2015. *Virologia Essencial & Víruses em Culturas tropicais*. Fortaleza, UFC. p 606.
- LIMA, M. F.; OLIVEIRA, V. R.; AMARO, G. B. 2015. Cucurbit-infecting viruses in Brazil. In *V International Symposium on Cucurbits* 1151: 251-258.
- LUIS-ARTEAGA, M.; ALVAREZ, J. M.; ALONSO-PRADOS, J. L.; BERNAL, J. J.; GARCÍA-ARENAL, F.; LAVIÑA, A.; MORIONES, E. 1998. Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Disease* 82: 979-982.
- MARTELLI, G. P.; ADAMS, M. J.; KREUZE, J. F.; DOLJA, V. V. 2007. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. *Annual review of phytopathology* 45.
- MARTIN, D.P., MURREL, B., GOLDEN, M., KHOOSAL, A., MUHIRE, B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1, vev003.
- MARTIN, R. R. & D'ARCY, C. J. 1990. Relationships among luteoviruses based on nucleic acid hybridization and serological studies. *Intervirology* 31: 23–30.
- MANGLLI, A.; MURENU, M.; SITZIA, M.; TOMASSOLI, L. 2016. First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus infecting cucurbits in Italy. *New Disease Reports* 34: 23-23.
- MAYO, V. & ZIEGLER-GRAFF. 1996. Molecular biology of luteoviruses. *Adv. Viruses Research* 46: 413–460.
- MAYO, M., RYABOV, E., FRASER, G., & TALIANSKY, M. 2000. Mechanical transmission of Potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 81(11): 2791-2795.
- MILLER, W. A.; S. J. LIU S. J.; BECKETT, R. 2002. Barley yellow dwarf virus: Luteoviridae or Tombusviridae?. *Molecular Plant Pathology* 3: 177–183.

- MILLER, W. A. & WHITE, K. A. 2006. Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication. *Annu. Rev. Phytopathol* 44: 447–467.
- MNARI-HATTAB, M., KUMMERT, J., ROUSSEL, S., EZZAIER, K., ZOUBA, A., JIJAKLI, H. 2005. First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Tunisia causing yellows on five cucurbitaceous species. *Plant Dis.*89, 776.
- MINK, G. I. 1993. Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. *Annual review of phytopathology*, 31(1), 375-402.
- MOONAN, F.; MOLINA, J.; MIRKOV, T. E. 2000. Sugarcane yellow leaf virus: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology*, 269: 156-171.
- MOLLOV, D.; MAROON-LANGO, C.; KUNIATA, L. 2016. Detection by next generation sequencing of a multi-segmented viral genome from sugarcane associated with Ramu stunt disease. *Virus genes* p. 1-4.
- MOURA, M. C. C. L.; LIMA, J. A. A.; OLIVEIRA, V. B.; GONÇALVES, M. F. B. 2001. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira* 26: 90-92.
- MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One* 9(9):e108277.
- MURAKAMI, R.; NAKASHIMA, N.; HINOMOTO, N.; KAWANO, S.; TOYOSATO, T.; 2011. The genome sequence of pepper vein yellows virus (family Luteoviridae, genus Polerovirus). *Archives of Virology* 156: 921-923.
- MUNIYAPPA, V.; REDDY, D. V. R. 1983. Transmission of Cowpea mild mottle virus by *Bemisia tabaci* in a non-persistent manner. *Plant Dis* 67:391–393.
- NAIDU, R. A., GOWDA, S., SATYANARAYANA, T., BOYKO, V., REDDY, A. S., DAWSON, W. O., & REDDY, D. V. R. 1998. Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus Carlavirus. *Archives of virology*, 143(4): 769-780.
- NAGATA, T.; ALVES, D. M. T.; INOUE-NAGATA, A. K et al. 2005. A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. *Arch Virol* 150:379–387.
- NAGATA, T.; DUTRA, L.S.; OLIVEIRA, P. A.; AVILA, A. C.; INOUE-NAGATA, A. K. 2010. Analysis of the triple gene block sequence in an important melon pathogen, Melon yellowing-associated virus. *J Gen Plant Pathol* 76:268–272.
- NAGATA, T.; KITAJIMA, E. W.; ALVES, D. M. T. et al. 2003. Isolation of a novel carlavirus from melon in Brazil. *Plant Pathol* 52:797.
- NICOLINI, C., INOUE-NAGATA, A.K., NAGATA, T. 2015. Complete genome sequence of a proposed new tymovirus, tomato blistering mosaic virus. *Arch. Virol.*160, 609-612.
- NIE, X.; BAI, Y.; MOLEN, T. A.; DESJARDINS, D. C. 2008. Development of universal primers for detection of potato carlaviruses by RT-PCR. *Journal of virological methods* 149: 209-216.
- NOURI, S.; SALEM, N.; NIGG, J. C; FALK, B. W. 2016. A diverse array of new viral sequences identified in worldwide populations of the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) using viral metagenomics. *Journal of virology* 90: 2434-2445.
- ORFANIDOU, C.; MALIOGKA, V. I.; KATIS, N. I. 2014. First Report of Cucurbit chlorotic yellows virus in Cucumber, Melon, and Watermelon in Greece. *Plant Disease*, 98(10), 1446-1446.
- OMAR, A.F., BAGDADY, N.A., 2012. Cucurbit aphid-borne yellows virus in Egypt. *Phytoparasitica*. 40, 177.
- OLIVEIRA, V.B.; LIMA, J. A. A.; VALE, C. C.; PAIVA, W. O. 2000. Caracterização

- biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. *Fitopatologia Brasileira* 25:628-636.
- PAGÁN, I. & HOLMES, E. C. 2010. Long-term evolution of the Luteoviridae: time scale and mode of virus speciation. *Journal of Virology* 84: 6177-6187.
- PALUKAITIS, P., ROOSSINCK, M. J., DIETZGEN, R. G., & FRANCKI, R. I. 1992. Cucumber mosaic virus. *Advances in virus research*, 41, 281-348.
- PEDROSA, J. F. & de FARIA, C. M. B. 1995. Cultura do melão. *Embrapa Semiárido-Folderes/Folhetos/Cartilhas (INFOTECA-E)*.
- PEDROSA, J.F. 1997. Cultura do melão. Mossoró: ESAM, 50p., (Apostila).
- PETER, K. A., GILDOW, F., PALUKAITIS, P., & GRAY, S. M. 2009. The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of virology*, 83(11): 5419-5429.
- PIRONE, T. P., & PERRY, K. L. 2002. Aphids: non-persistent transmission. *Advances in botanical research*, 36, 1-19.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Bio. Evol.* 25, 1253-1256.
- POZZER, L.; RESENDE, R. O.; BEZERRA, I. C.; NAGATA, T.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E. W.; ÁVILA, A.C. 1996. Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV), a proposed new species in the Tospovirus genus. *Fitopatologia Brasileira* 21: 432.
- PURCIFULL, D.; EDWARDSON, J.; HEIBERT, E. 1984. Watermelon mosaic virus 2. *Description of Plant Viruses. CMI/AAB P. 4*
- RABELO FILHO, F. A. C. R.; NICOLINI, C.; RESENDE, R. O. et al. 2013. The complete genome sequence of a Brazilian isolate of yam mild mosaic virus. *Arch Virol* 158:515–518.
- RIVAS, E. B. 2010. Lily symptomless virus no Brasil. *Documento técnico* 4: 1-5.
- ROBINSON, R. W. & DECKER-WALTERS, D. S. 1999. Cucurbits. CAB International, Wallingford, Oxon.
- RAMBAUT, A., LAM, T.T., CARVALHO, L.M., PYBUS, O.G. 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol.* 2, vew007.
- SANTOS, A.A., CARDOSO, J.E., BEZERRA, M.A., PINHEIRO NETO, L.G. 2008. Progress analysis and damages due to melon yellowing-associated virus. *Summa phytopathol.* 34, 4, 359-360.
- SEBRAE. 2015. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Agronegócio Fruticultura. Boletim de Inteligência.
- SHALITIN, D. & WOLF, S. 2000. Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant physiology* 123: 597-604.
- SILVEIRA, L. M.; QUEIROZ, M. A.; LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; LIMA NETO, I. S. 2009. Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. *Tropical Plant Pathology* 34: 123- 126.
- SIMMONS, H. E.; DUNHAM, J. P.; ZINN, K. E.; MUNKVOLD, G. P.; HOLMES, E. C.; STEPHENSON, A. G. 2013. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus research* 176: 259-264.
- STEPANSKY, A.; KOVALSKI, I.; PERLTREVES, R. 1999. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematic Evolution*, 217(2): p.313-332.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D. et al. 2013. Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:725–2729.

- TAKANAMI, Y. & KUBO, S. (1979a). Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. *Journal of General Virology* 44, 153-159.
- TERRADOT, L., SOUCHET, M., TRAN, V., & DUCRAY-BOURDIN, D. G. 2001. Analysis of a three-dimensional structure of Potato leafroll virus coat protein obtained by homology modeling. *Virology*, 286,1: 72-82.
- TOMASSOLI, L. 2007. First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Italy. *Plant Pathol.* 56, 720-720.
- TROPICS, S. A. & PATANCHERU, P. O. 1983. Transmission of cowpea mild mottle virus by *Bemisia tabaci* in a nonpersistent manner. *Plant Disease* 67: 391.
- TURNER, R. L., GLYNN, M., TAYLOR, S. C., CHEUNG, M. K., SPURR, C., TWELL, D., & FOSTER, G. D. 1999. Analysis of a translational enhancer present within the 5'-terminal sequence of the genomic RNA of potato virus S. *Archives of virology*, 144(7), 1451-1461.
- VALKONEN, J. P. 2007. Viruses: economical losses and biotechnological potential. *Potato biology and biotechnology: Advances and perspectives*, 619-641.
- VAN BRUNSCHOT, S.L.; BERGERVOET, J.H.; PAGENDAM, D.E. . 2014. A bead-based suspension array for the multiplexed detection of begomoviruses and their whitefly vectors. *J Virol Methods* 198: 86-94.
- VAN DEN HEUVEL, J. F.; VERBEEK, M.; VAN DER WILK, F. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Journal of General Virology*, 75,10: 2559-2565.
- VEERAKONE, S., TANG, J. Z., WARD, L. I., LIEFTING, L. W., PEREZ-EGUSQUIZA, Z., LEBAS, B. S. M., & GUY, P. L. 2015. A review of the plant virus, viroid, liberibacter and phytoplasma records for New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 44(5): 463-514.
- XIANG, H. Y.; SHANG, Q. X.; HAN, C. G.; LI, D. W.; YU, J. L. 2008. Complete sequence analysis reveals two distinct poleroviruses infecting cucurbits in China. *Archives of virology* 153: 1155.
- XIANG, H. Y.; SHANG, Q. X.; HAN, C. G.; LI, D. W.; YU, J. L. 2008. First report on the occurrence of Cucurbit aphid-borne yellows virus on nine cucurbitaceous species in China. *Plant Pathology*, 57, 2: 390-390.
- WARREN, M.; KRUGER, K.; SCHOEMAN, A. S. 2005. Potato virus Y (PVY) and Potato Leafroll virus (PLRV). *A South African perspective*. University of Pretoria, 32pp.
- YANG, B. I.; YONGHONG, G. E.; CHUNLING, W. A. N. G.; XUEWEN, L. 2005. Melon production in China. In *III International Symposium on Cucurbits* 731: 493-500.
- YANG, X., THANNHAUSER, T. W., BURROWS, M., COX-FOSTER, D., GILDOW, F. E., & GRAY, S. M. 2008. Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (Luteoviridae). *Journal of virology*, 82(1), 291-299.
- YARDIMCI, N. AND ÖZGÖNEN, H. 2007. First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Turkey. *Australas. Plant Dis.* 2, 59.
- YUKI, V. A.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W.; BARROSO, P. A. V.; KUNIYUKI, H.; GROPPA, G. A.; PAVAN, M. A. 2000. Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 84: 516-520.
- ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research* 18: 821-829.
- ZERBINO, D.R., MCEWEN, G.K., MARGULIES, E.H., BIRNEY, E. 2009. Pebble and Rock Band: Heuristic Resolution of Repeats and Scaffolding in the Velvet Short-



Read de Novo Assembler. PloS One. 4, 8407.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics* 38: 95-109.

ZHAO, M. F.; CHEN, J.; ZHENG, H. Y.; ADAMS, M. J.; CHEN, J. P. 2003. Molecular analysis of Zucchini yellow mosaic virus isolates from Hangzhou, China. *Journal of Phytopathology* 151: 307-311.

ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. 1996. (Ed.) Compendium of cucurbit diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.(EUA). p. 87.