



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

Uma Abordagem Biológica e Molecular de Estudos do *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), Uma Espécie Diferenciada do Grupo Americano de *Tospovirus*.

MIKHAIL OLIVEIRA LEASTRO

BRASÍLIA 2011



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

Uma Abordagem Biológica e Molecular de Estudos do *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), Uma Espécie Diferenciada do Grupo Americano de *Tospovirus*.

Mestrando: Mikhail Oliveira Leastro

Orientador: Renato de Oliveira Resende

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em fitopatologia, do departamento de fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de grau de mestre em Fitopatologia.

BRASÍLIA 2011

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob a orientação do professor Dr. Renato de Oliveira Resende. Tendo apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro do CNPq.

Banca examinadora:

Dr. Renato de Oliveira Resende

Universidade de Brasília (Orientador)

Dr. Tatsuya Nagata

Universidade de Brasília

Dra. Marília Santos Silva

Embrapa/Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC)

Aos meus pais, irmãos, familiares e amigos. **OFEREÇO**

DEDICO a “Tia Gracita” (*Maria da Graça*) “*in memoriam*” por toda ajuda, confiança e tempo a mim dedicado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial às pessoas que me orientaram e incentivaram durante a elaboração e condução do trabalho de dissertação. Renato de Oliveira Resende (Orientador), pelo incentivo, apoio e confiança e Mirtes Freitas Lima (Co-orientadora) que me concedeu espaço para a execução do meu trabalho e por me orientar na bancada, me auxiliando no desenvolvimento da pesquisa e pelos ensinamentos iniciais na bancada no âmbito da virologia molecular.

À minha família, pelo incentivo e confiança que sempre depositaram em mim e em especial a minha mãe Joana D'arc Oliveira ao meu pai Waldimir Leastro dos Santos e irmãos Wladison Oliveira Leastro e Caio Eduardo Oliveira Leastro que desfrutaram de todos momentos da vida, comigo, como se tudo não passasse de fantasia como de fato eu imagino que seja.

Aos meus primos Alexandre Leastro, Felipe Moreno, Andrea Leastro, Lucas Freire e Gustavo Garces que sempre estiveram ao meu lado desfrutando dos melhores momentos da minha vida e às vezes até me “desvirtuando” nos momentos que deveriam ser dedicados aos estudos, mas claro, isso também faz parte da diversão.

Às minhas avós, Benedita Cantanhede e Maria das Neves que contribuíram com seus ensinamentos para o meu amadurecimento.

Agradecimento especial à Tia Gracita “*in memoriam*” que contribuiu bastante para que eu chegasse até aqui e me serviu como fonte de inspiração para alcançar os objetivos que eu me indago que valessem a pena até esse momento da vida.

Ao Athos Oliveira pelos ensinamentos de bancada e que bastante me ajudou durante toda a elaboração dessa dissertação. Ao Lúcio Flávio pelos ensinamentos sorológicos e biológicos dentro do aspecto da virologia e a Mônica Macedo que passou comigo todos os momentos de alegrias e frustrações durante o desenvolvimento dos nossos trabalhos.

Aos amigos que fiz na minha estadia na Embrapa, Sarinha, Mary, Natália Alencar e Natália Nascimento, Oneilson, Bruna, Hamilton, Gabi, Lúcio, Vinícius, Talita, Érico e a todos os demais.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e em especial ao prof. Tatsuya Nagata (Departamento de Biologia

Celular) pela ajuda na análise de sequência e à Prof.^a Rita de Cássia e ao prof. Helson Martins que além de bons professores, são também excelentes conselheiros e procuram entender bem o estudante.

Aos amigos “mades” que tanto gosto e admiro: Claudênia, Érica, Kamila, Jessica, Cecília, Nara, Naiara, Pablo, Maria, Maíra, Andressa, Ana, Liamar, Leandro e Brauna. E aos novos amigos que eu adquirir nas viagens de congresso, Bruninha, Débora, Taty e Rodrigo.

Aos amigos que na sextas feiras de por do sol viram, comigo, o mundo girar durante os dois anos do curso de mestrado, momentos estes sempre prazerosos acompanhados de pessoas especiais. Daniel Lage, Justino Dias, Natália Lucinda, Mônica Macedo, Reinaldo e o mais novo integrante Professor Helson.

Ao CNPq pelo auxílio concedido.

A Embrapa Hortaliças e a Universidade de Brasília pela infra-estrutura para a concepção dos experimentos.

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| PREFÁCIO..... | i,ii,iii |
| DEDICATÓRIA..... | iv |
| AGRADECIMENTOS..... | v |
| ÍNDICE..... | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS, IMAGENS E TABELAS..... | ix |
| RESUMO..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 4 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 7 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 10 |
| 1 - Família <i>Cucurbitaceae</i> | 10 |
| 2 - O Gênero <i>Tospovirus</i> | 12 |
| 3 - <i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> (ZLCV), Aspectos Gerais..... | 16 |
| 4 - Aspectos Sorológicos do Gênero <i>Tospovirus</i> | 20 |
| 5 - Proteína Supressora de Silenciamento Gênico em <i>Tospovirus</i> , NSs..... | 22 |
| 6 - Filogenia, Identidade e Análise de Domínios do Gênero <i>Tospovirus</i> | 24 |
| OBJETIVOS GERAIS..... | 27 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| 1 - Estudos Biológicos..... | 28 |
| 1.1 - Obtenção do Isolado de ZLCV..... | 28 |
| 1.2 - Manutenção e Multiplicação do isolado de ZLCV..... | 28 |
| 1.3 - Espectro de Plantas Hospedeiras..... | 29 |
| 2 - Estudos Sorológicos..... | 31 |
| 2.1 - Multiplicação do Inóculo para Purificação Viral..... | 31 |
| 2.2 - Purificação Viral..... | 31 |
| 2.3 - Eletroforese (SDS-PAGE)..... | 32 |
| 2.4 - Imunização de Coelhos para Produção do Anti-soro..... | 33 |
| 2.5 – Semi-purificação de Anticorpo..... | 34 |
| 2.5.1 - Adsorção do Anti-soro..... | 34 |
| 2.6 - Validação do Anti-soro por Dot-ELISA..... | 35 |
| 3 - Estudos Moleculares..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.1 - Extração de RNA Total..... | 36 |
| 3.2 - Extração de RNA Viral..... | 37 |
| 3.3 - Transcrição Reversa (RT) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)..... | 37 |
| 3.4 - Purificação de DNA..... | 39 |
| 3.5 - Preparação de Células Competentes (DH5- α)..... | 40 |
| 3.6 - Clonagem do Gene NSs e Seleção de Recombinantes..... | 40 |
| 3.7 - Sequenciamento..... | 42 |
| 3.8 - Análise das Sequências..... | 42 |
| RESULTADOS..... | 43 |
| 1 - Estudos Biológicos..... | 43 |
| 1.1 - Confirmação da Ausência de Infecção Mista..... | 43 |
| 1.2 - Círculo de Hospedeiras..... | 44 |
| 2 - Estudos Sorológicos..... | 47 |
| 3 - Estudos Moleculares..... | 50 |
| 3.1 - Análise de Identidade da Proteína NSs de ZLCV dentro do Gênero <i>Tospovirus</i> | 52 |
| 3.2 - Análise Filogenética com Base na Proteína NSs..... | 54 |
| 3.3 - Diversidade de Sequência da Proteína Supressora de Silenciamento Gênico (NSs) dos <i>Tospovirus</i> | 55 |
| DISCUSSÃO..... | 56 |
| PERSPECTIVAS..... | 62 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 63 |
| ANEXO..... | 71 |

ÍNDICE

FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

- Figura 1 - Organização dos segmentos genômicos de *Tospovirus*. Pág 13.
- Figura 2 - Árvores filogenéticas das espécies de *Tospovirus* baseado na proteína N e NSm. Fonte: Silva et al., 2001. Pág 14.
- Figura 3 - Mapa do estado de São Paulo indicando a distribuição de ZLCV em espécies de cucurbitáceas em 21 de 40 regiões produtoras Pág 19.
- Figura 4 - Árvore filogenética baseada em sequências de aminoácidos precursores da proteína G. Fonte: Nagata et al., (2007). Pág 26.
- Figura 5 - Alinhamento da sequência de nucleotídeos da NSs de TSWV BR 20 e INSV utilizando o programa CLUSTALX 2.0.12. Pág 38.
- Figura 6 - Representação esquemática de amplificação da NSs do ZLCV. Pág 39 .
- Figura 7 - Amplificação de região da sequência do SRNA (N) visualizada em gel de agarose 1,0%, Pág. 45.
- Figura 8 - Análise do peso molecular da proteína do nucleocapsídeo de ZLCV a partir de extratos purificados via análise em gel de poliacrilamida. Pág 47.
- Figura 9 - Dot-ELISA para validação do anti-soro contra ZLCV. Pág 48.
- Figura 10 - Ensaio Dot-ELISA para avaliar especificidade do anti-soro de ZLCV com os *Tospovirus* TSWV, GRSV e TCSV. Pág 49.
- Figura 11 - Amplificação do gene da proteína NSs de ZLCV visualizado em gel de agarose 0,8%. Pág 50.
- Figura 12 - Amplificação por PCR da porção N terminal do gene NSs analisada em gel de agarose 0,8%. Pág 51.
- Figura 13 - Representação esquemática de amplificação da NSs do ZLCV. Pág 51.
- Figura 14 - Árvore filogenética de espécies de *Tospovirus* baseado na proteína NSs. Pág 54.
- Figura 15 - Alinhamento múltiplo de aminoácidos das proteínas NSs de *Tospovirus*. Pág 71, 72 e 73.
- Figura 16 - Sequências de nucleotídeos e aminoácidos da ORF NSs de ZLCV. Pág 74.
- Figura 17 - Plantas inoculadas com ZLCV, círculo de plantas hospedeiras. Pág 75 e 76.

Tabela 1 - Plantas utilizadas para o círculo de hospedeiras de *Zucchini lethal chlorosis virus*. Pág 30.

Tabela 2 - Círculo de plantas hospedeiras de ZLCV determinado via inoculação mecânica em diversas espécies de plantas. Pág 46.

Tabela 3 - Identidade (%) de aminoácidos da NSs entre *Tospovirus*. Pág 52.

Gráfico 1 - Resultado do teste DAS-ELISA usando anti-soro policlonal. Pág 43.

RESUMO

Uma Abordagem Biológica e Molecular de Estudos do *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), Uma Espécie Diferenciada do Grupo Americano de *Tospovirus*.

O gênero *Tospovirus* pertence à família *Bunyaviridae* que tem como espécie tipo *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Espécies deste gênero possuem grande relevância para as hortaliças, principalmente, para as culturas do tomate e do pimentão, nas quais causam perdas significativas. Além de TSWV, várias outras espécies de *Tospovirus* causam perdas de impacto na produção agrícola no País, como *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) que infecta abobrinha-da-moita, melancia e melão, *Groundnut ringspot virus* (GRSV) em tomate, pimentão e alface, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) em tomate e pimentão, *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CNSV) em plantas ornamentais e *Iris yellow spot virus* (IYSV) em cebola. Estas espécies apresentam um espectro de hospedeiras de tamanho relevante. A doença tipo é chamada de “vira-cabeça” e está entre os principais problemas fitossanitários em variedades destes grupos de plantas. Em cucurbitáceas a doença é denominada de amarelo letal da abobrinha-da-moita.

O *Zucchini lethal chlorosis virus* é uma espécie que foi descrita apenas no Brasil, principalmente nas regiões produtoras de cucurbitáceas dos Estados de São Paulo e de Tocantins, infectando, especialmente, abobrinha-da-moita, melão e melancia. Em relação às demais espécies do gênero *Tospovirus*, ZLCV é a única que demonstra uma restrição em relação ao espectro de hospedeiras, fato este que pode estar envolvido com a proteína de movimento viral (NSm) e a proteína supressora de silenciamento gênico (NSs). Estes pontos reforçam o principal objetivo do presente trabalho que é a caracterização da proteína supressora de silenciamento NSs e um comparativo molecular desta com as demais NSs caracterizadas até o momento dentro do gênero e dentro da família do vírus. Além desse aspecto, ZLCV vem demonstrando um aumento de incidência infectando cucurbitáceas, ficando atrás apenas de *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Diante dessa problemática surgem mais dois objetivos no trabalho, o entendimento mais amplo

em relação ao espectro de hospedeiras do vírus e o desenvolvimento de um anti-soro eficiente para a diagnose do vírus.

Para a caracterização molecular da NSs do ZLCV, foi utilizado um *primer* (Oligonucleotídeo) degenerado sentido senso que se anelou após o códon iniciador e um antisense, que se anelou na região *hairpin* (em formato de grampo) do segmento S do genoma viral. Esta combinação resultou na amplificação de um fragmento de aproximadamente 2.000 pb da NSs do vírus e parte da região intergênica do segmento S, faltando apenas um pequeno fragmento para o sequenciamento total da NSs. Foi desenhado então outro *primer* antisense que se anelou no início do genoma e que em combinação com o *primer* J13 que se anela na região consenso de todos os segmentos do genoma de vírus deste gênero, foi obtido o restante da sequência. Comparando-se a NSs do ZLCV com segmentos correspondentes das demais espécies do grupo Americano e do grupo Euro-Asiático obteve-se identidade máxima de 73,2% com TSWV.

Com base na análise de identidade e na análise filogenética da proteína NSs de *Tospovirus* foi levantada a hipótese de que a restrição do círculo de hospedeiras do ZLCV poderia estar relacionada com a diferenciação de regiões da proteína NSs que tenham relação com a supressão do silenciamento. O que poderia estar causando a sua restrição em relação à infecção de novas hospedeiras. A demais é sugerida a utilização das proteínas NSs como um valor adicional na classificação das espécies do gênero *Tospovirus*.

Para a produção do anti-soro foram imunizados dois coelhos. O anticorpo produzido apresentou reação cruzada com TCSV e GRSV, entretanto, em uma concentração de 1:500 foi possível diagnosticar a presença do ZLCV na planta e a ausência de reação cruzada. No círculo de hospedeiras foram testadas 23 diferentes cultivares de cucurbitáceas (um aumento relevante em relação aos outros ensaios já feitos de espectro de hospedeiras do vírus), além de plantas pertencentes a outras famílias como *Solanaceae*, *Convolvulaceae*, *Amaranthaceae*, *Fabaceae* e *Chenopodiaceae*. Foi identificada por sorologia e/ou reação da polimerase em cadeia (PCR) a presença do ZLCV em um número pequeno de plantas o que não representa uma co-evolução do vírus para à infecção de hospedeiras alternativas.

O ensaio sorológico contribuirá para otimizar a diagnose viral, considerando que ZLCV vem ocorrendo em maior incidência em plantações de

cucurbitáceas. O ensaio biológico e o ensaio molecular geraram informações que contribuíram ao melhor entendimento da relação patógeno x hospedeira, considerando-se que ZLCV é uma espécie dentro do gênero *Tospovirus* que apresenta restrição em relação a plantas hospedeiras. O entendimento dos eventos que induzem a essa restrição podem, de alguma forma, ser empregados na determinação de medidas a serem empregadas no controle das espécies de *Tospovirus*.

ABSTRACT

Biological and Molecular Studies Approaches to *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) Investigation, A Differentiated Species of the American Group of *Tospovirus*

The genus *Tospovirus* belongs to the *Bunyaviridae* family and has *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) as type species. Species within this genus are of great relevance to vegetable crops, especially, on tomatoes and peppers on which these viruses can cause severe economical losses. In addition to TSWV, there are other *Tospovirus* species which have an impact on vegetable production in the country, such as *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) infecting cucurbits, especially squash, *Groundnut ringspot virus* (GRSV) on tomato, pepper and lettuce, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) on tomato and pepper, *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CNSV) on ornamental plants and *Iris yellow spot virus* (IYSV) on onion. The disease caused by these viruses is commonly called a “top distortion of tomato plant”, being among the major diseases on various groups of plants. In cucurbitaceous the disease is known as lethal yellowing of squash.

Zucchini lethal chlorosis virus has been detected and characterized only in Brazil, mainly in cucurbit producing areas of the State of São Paulo and State of Tocantins. This virus infects squash, melon and watermelon crops. Comparing to other *Tospovirus* species found in Brazil, ZLCV is reported to infect just a few plant species, which may be related to the viral movement protein (NSm) and/ or to the gene silencing suppressor protein (NSs). From this premise, the main objective of this work was to perform the molecular characterization of the NSs, putative silencing suppressor protein and also to perform a comparative analysis with other NSs proteins characterized until now within the genus *Tospovirus* and within the *Bunyaviridae* family. Also, considering that ZLCV incidence in cucurbit species has increased in the last years, the present work includes an investigation on the host range of ZLCV and also the development of an antiserum to be used in the ZLCV detection.

To obtain the sequence of ZLCV NSs to perform the molecular characterization, a pair of primers was used in an RT-PCR reaction. A forward

degenerate primer was designed which annealed after the start codon onto the viral sequence and a reverse primer (UHP) that annealed onto the "hairpin" region of the genome sequence of the S RNA segment. That primer combination amplified a 2000 bp fragment which corresponded to the NSs partial sequence and part of the intergenic region of the S segment. In order to obtain the complete NSs sequence including the C-terminal sequence of S RNA, another reverse primer was designed to anneal onto the 5' end region of the NSs sequence. The reverse primer in combination with J13 primer (anneal onto the consensus region present in all three segments of the viral genome within the genus) made it possible to amplify the remaining fragment and complete the NSs sequence. Comparative analysis of nucleotide and amino acid sequences of the NSs ZLCV with the corresponding sequences of other tospovirus clustered in the American and in the Asian groups indicated a maximum identity of 73.2% with TSWV NSs sequence.

Based on the identity and on the phylogenetic analysis of the NSs and NSm proteins of tospoviruses it was hypothesized that the restriction of the host range of ZLCV may be related to the gene silencing suppressor protein (NSs) and viral movement protein (NSm) influencing virus/ host interactions. Analysis of amino acid sequences of the NSm protein showed that ZLCV and INSV differ most from other species in the American group. In addition, larger identity value of 71% was observed between ZLCV and of CSNV NSm proteins. Considering that, it is likely that non-structural proteins of tospoviruses may be associated to virus pathogenicity and having some influence on the size of its host range. Beyond the hypothesis suggested the use of NSs proteins as an additional parameter in the classification of the genus *Tospovirus*.

Antiserum production was carried out using two rabbits. By dot-ELISA, the ZLCV antibodies cross-reacted with TCSV and GRSV and at 1:500 dilution it was possible to detect just ZLCV presence in infected plants. To investigate the host range of ZLCV, 23 cucurbit plants including different cultivars and species, and also species from *Solanaceae*, *Convolvulaceae*, *Amaranthaceae*, *Fabaceae* and *Chenopodiaceae* families were tested in this assay. Virus detection on inoculated plants was done by serology and by PCR and the results indicated ZLCV presence in just a few plant species and/or cultivars, indicating no evolution in virus infection of new hosts, therefore confirming the restrict host range nature of the ZLCV.

Considering that ZLCV has been occurring in an increasing incidence in cucurbit crops, within the last years, the antiserum produced in this work will contribute to a better viral diagnosis. The biological and the molecular data generated will contribute to a better understanding of host pathogen interaction, considering that ZLCV has a restricted host range when compared to other *Tospovirus* species. These data all together will help to understand the host range restriction of this *Tospovirus* species which may be useful to search for strategies virus control.

INTRODUÇÃO GERAL

A família *Bunyaviridae* apresenta 5 gêneros: *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Tospovirus* e um possível tentativo gênero denominado *Tenuivirus*. Dentro da família o único que é patogênico a plantas é o gênero *Tospovirus*. As espécies desse gênero são causadoras da doença “vira-cabeça-do-tomateiro” e caracteriza-se por apresentar RNA sentido negativo fita simples (ssRNA-), estratégia de replicação ambisenso, genoma tripartido com segmentos L, M e S, grande, médio e pequeno respectivamente (Bishop, 1986; De Haan et al., 1990; Elliott, 1990, Goldbach & Peters, 1996; Mohamed et al., 1973)

O segmento L é responsável por codificar a RNA polimerase viral, necessária para a replicação do vírus (Peters et al., 1991). O segmento M codifica as glicoproteínas G1 e G2 que se associam a membrana lipídica que envolve a partícula viral. Além de codificar as glicoproteínas, este segmento também é responsável por codificar uma proteína não estrutural, envolvida no movimento do vírus célula a célula, a NSm. O segmento S codifica a proteína N do nucleocapsídeo (Elliott, 1989, 1990) e uma proteína não estrutural que está ligada a supressão do silenciamento gênico, a NSs (Takeda et al., 2002).

Dentro do gênero *Tospovirus* existem várias espécies que afetam cucurbitáceas. A família *Cucurbitaceae* apresenta cerca de 80 gêneros e mais de 800 espécies, dentre essas, várias são de grande valor econômico. No Brasil, as espécies com maior representação econômica pertencem aos gêneros *Cucurbita* (moranga, abóbora e abobrinha), *Cucumis* (melão e pepino), *Citrullus* (melancia) e *Suchium* (chuchu) e grande maioria delas são infectadas por vírus pertencentes ao gênero *Tospovirus* (Robbinson & Decker-Walters, 1997). Entre essas espécies encontra-se uma caracterizada apenas no Brasil, *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), cuja incidência é observada em grandes áreas cultivadas de abobrinha com as plantas apresentando sintomas de desnutrição e perda da produtividade de frutos comercializáveis (Bezerra et al., 1999; Rezende et al., 1995, 1996, 1997; Giampan et al., 2007). Este vírus se espalhou do Estado de São Paulo para as áreas centrais de Brasil, aumentando sua importância como causador de perdas econômicas em cucurbitáceas (Nagata et al., 1998, Giampan et al., 2007).

ZLCV apresenta partículas esféricas envelopadas, de aproximadamente 80 a 90 nm de diâmetro. Seu genoma de RNA contém três segmentos com tamanhos correspondentes ao do TSWV. A identidade da sequência de aminoácidos deduzidos do gene da proteína do nucleocapsídeo do ZLCV com a de outros *Tospovirus* tem uma variação de 20 a aproximadamente 80% (Bezerra et al., 1999 & Resende et al., 1996).

A incidência do ZLCV pode ser constatada nos trabalhos de Rezende et al. (1995, 1997), que relatam a ocorrência de viroses em vários Estados do Brasil. Foi avaliado a ampla incidência do ZLCV em plantações de abobrinha no estado de São Paulo em cerca de 50,6% (média) das áreas cultivadas. Em outro trabalho que avaliou a incidência de cinco espécies virais em cucurbitáceas produzidas em regiões agrícolas do Estado de São Paulo, demonstrou a prevalência de *Papaya ringspot virus* tipo W (PRSV-W) e do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), com 49,1% e 24,8% respectivamente, seguidos por ZLCV com 7,8% (Yuki et al., 2000). Em um estudo posterior sobre a distribuição viral no estado do Mato Grosso do Sul verificaram que os vírus mais incidentes foram PRSV-W, ZLCV e ZYMV com incidência média de 63,4%; 56,1% e 41,4% respectivamente (Stangarlin et al., 2001). Também, foi observada sua presença no Distrito Federal atacando a cultura de pepino (Nagata et al., 1998). Nesses estudos, verificou-se a sintomatologia apresentada pela infecção do vírus, os sintomas observados foram clorose e necrose sistêmica em folhas, enrolamento da folha apical, redução do limbo foliar, má formação dos frutos, escurecimento da casca e nanismo da planta (Giampan et al., 2007).

A sorologia é bastante difundida para a diagnose de vírus. Na virologia vegetal utiliza-se de alguns testes para a diagnose viral como, por exemplo, o teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), Dot Blotting e Western Blotting. No gênero *Tospovirus*, a produção de anti-soro para a detecção das espécies virais é feito com base na proteína do nucleocapsídeo viral (proteína N), que após a purificação, é empregada na imunização de animais como ratos ou coelhos para a produção de anticorpos específicos. Dentro do gênero, devido a identidade das proteínas do nucleocapsídeo viral, observam-se reações cruzadas entre algumas espécies de *Tospovirus* do grupo Americano (Dados não mostrados), mas com a utilização da técnica de ELISA é possível distinguir bem as espécies de *Tospovirus* (De Ávila et al., 1993; Bezerra et al., 1999). A

sorologia ainda é considerada um método mais barato para a diagnose viral em larga escala quando comparada a diagnose molecular. Levando em conta que as enzimas utilizadas para detecção molecular são extremamente caras, em contrapartida os reagentes para a detecção sorológica não são caros tanto quanto.

Devido ao aumento da incidência do ZLCV em cucurbitáceas, principalmente em regiões com extensas áreas de cultivo como o estado de Tocantins (Dr. Raimundo Aguiar - UFT, comunicação pessoal) torna-se essencial a obtenção de um anti-soro eficiente para a diagnose do vírus, além disso, a disponibilização de uma ferramenta sorológica poderá contribuir em estudos mais aprofundados da interação vírus/hospedeiras. Através do estudo amplo do espectro de hospedeiras do vírus, permitirá um entendimento sobre a capacidade do vírus de infectar ou não novas hospedeiras, fator determinante na epidemiologia viral e definição de estratégias de controle, além de um entendimento inicial da estabilidade ou variabilidade biológica do vírus com base na manutenção ou aumento do espectro de plantas hospedeiras.

Um aspecto biológico peculiar do ZLCV é seu restrito espectro de hospedeiras. Suas hospedeiras naturais são as cucurbitáceas, sendo que, experimentalmente outras poucas famílias botânicas são infectadas pelo vírus (Bezerra et al., 1999, Rezende et al., 1995, 1997, Resende et al., 1996, Giampan et al., 2007). Um fator que limita sua infecção em outras espécies de plantas pode está relacionado a proteínas de movimento NSm e/ou a proteína NSs ligada ao processo de supressão do mecanismo de silenciamento gênico.

O silenciamento gênico refere-se a uma série de mecanismos bioquímicos por meio dos quais a expressão de um ou mais genes é regulada negativamente, ou seja, regulação da super-expressão de um gene. Por sua forma de ação, o silenciamento gênico pós-transcricional acaba sendo uma ferramenta de defesa da planta contra infecção viral. Muitos estudos estão sendo feitos com a construção de plantas transgênicas que carregam segmentos de vírus que são capazes, após uma infecção viral, de desencadear o processo de silenciamento gênico. Como, por exemplo, o trabalho de Hassani-Mehraban et al. (2009), no qual a construção de uma fita cassete quimérica de 5 espécies de *Tospovirus* com posterior agroinoculação em *Nicotiana benthamiana* foi capaz de produzir um transgene que conferiu resistência ampla a diferentes espécies de *Tospovirus*. A mesma capacidade que a planta tem de evitar a infecção viral, o vírus tem de

burlar o mecanismo de defesa da planta. A supressão do silenciamento gênico é uma forma pela qual o vírus tem de suprimir a defesa da planta.

O mecanismo de supressão do silenciamento gênico nas infecções causadas por *Tospovirus* é incitado por uma proteína não estrutural do vírus, a NSs codificada a partir do segmento S do genoma viral. Muitos trabalhos estão sendo realizados visando o entendimento da atuação da NSs na supressão do silenciamento gênico, através de táticas de co-inoculação de uma estirpe viral infectiva e outra não infectiva, avaliando a supressão do silenciamento pela estirpe não infectiva (Hassani-Mehraban et al., 2009). Outras estratégias de estudo envolvem a construção de vetores que expressam a proteína supressora do silenciamento gênico, onde foi observada a eficiência da proteína NSs na quebra da resistência da hospedeira (Hassani-Mehraban et al., 2009).

No gênero *Tospovirus*, alguns trabalhos buscaram o entendimento da relação filogenética, de identidade e a presença de domínios proteicos “protein motifs” entre as espécies do gênero (Silva et al., 2001; Nagata et al., 2007, Pappu et al., 2000) considerando várias proteínas virais como a N, NSm e G e regiões intergênicas (IGR). Uma análise filogenética semelhante de identidade da proteína NSs, que potencialmente possui uma atuação crucial na infecção dos *Tospovirus*, torna-se relevante no âmbito da classificação taxonômica do gênero como observado nos trabalhos de Nagata et al., (2007) e Silva et al., (2001) para as proteínas NSm e G. A comparação entre as proteínas NSs pode atuar como características adicionais na classificação de espécies do gênero com base na sua análise filogenética.

A geração de conhecimento científico sobre a atuação da proteína supressora de silenciamento (NSs) no processo de infecção viral e sua potencial ação na interação patógeno/hospedeira poderá favorecer o entendimento dos mecanismos de virulência do patógeno, bem como, dos mecanismos de defesa das hospedeiras. Esses dados analisados conjuntamente podem ser usados para elucidar o processo evolutivo das espécies de *Tospovirus* em diferentes regiões geográficas do mundo, além de possibilitar a geração de tecnologia para o controle desses fitopatógenos.

REVISÃO DE LITERATURA

1 - A Família *Cucurbitaceae*

Cucurbitaceae é historicamente uma das famílias botânicas mais importantes utilizadas para a produção de alimentos, fibras e fitoterápicos (Montes et al., 2002, Cardoso 2003). Constitui-se de plantas dicotiledôneas que reúne cerca de 80 gêneros e mais de 800 espécies, dentre as quais, várias são domesticadas e apresentam importância para o homem tais como abóbora, melão, melancia, pepino e abobrinha.

A produção mundial das principais culturas de cucurbitáceas (melancia, pepinos, abóboras e melões) representam 20 % da produção total de produtos olerícolas do mundo. A melancia é a principal cultura cucurbitácea no mundo com cerca de 40% da produção mundial de cucurbitáceas, seguida do pepino com 27%, melão 20% e abóbora com 12% (Robinson et al., 1999).

No Brasil, as espécies mais representativas economicamente pertencem ao gênero *Cucurbita* (abóbora, abobrinha e moranga), *Cucumis* (Pepino, melão e maxixe), *Citrullus* (melancia), *Sechium* (chuchu) e *Lagenaria* (cabaça caxi). Lopes (1991). Os principais pólos produtores de cucurbitáceas no Brasil são as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste; o Nordeste é responsável pela grande produção nacional de melancia que é a principal cucurbitácea produzida no país que possui um rendimento médio de produção de 21.286 quilogramas por hectare, dado obtido entre os anos de 2005-2009 (IBGE, 2011).

Essas culturas são afetadas por inúmeras doenças principalmente de natureza viral. É observada a infecção de inúmeras espécies de cucurbitáceas no Brasil e os principais vírus observados foram *Squash mosaic virus*, SqMV (Lima & Amaral, 1985); *Cucumber mosaic virus*, CMV (Cupertino et al., 1988); *Papaya ringspot virus*, PRSV (Lima et al., 1996), *Watermelon mosaic virus-2*, WMV-2 (Sá & Kitajima, 1991) e *Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV (Lima et al., 1996).

Mas recentemente *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) tem chamado atenção dos produtores pela sua alta incidência e perdas de produção principalmente nas regiões de São Paulo e Tocantins (Dr. Raimundo Aguiar – UFT, Dr. Jorge Rezende - ESALQ, comunicação pessoal). Diversos estudos de

incidência viral em áreas produtoras no Brasil demonstram o aumento da incidência do ZLCV no país (Rezende et al., 1995, 1997; Yuki et al., 2000; Nagata et al., 1998) e estudos também demonstram perdas de produção de frutos comercializáveis pela infecção do ZLCV (Giampan et al., 2009).

2 - O Gênero *Tospovirus*

A família *Bunyaviridae* apresenta 5 gêneros: *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Tospovirus* e um possível tentativo gênero denominado, *Tenuivirus*. O gênero *Tospovirus* é o único gênero da família *Bunyaviridae* que inclui espécies de vírus capazes de infectar plantas. Os vírus são geralmente esféricos ou pleomórficos de 80-120 nm de diâmetro possui um envelope lipídico, o qual se associa com as glicoproteínas virais de aproximadamente 5nm. Composição do vírion é de 5% de ácido nucléico, 70% de proteína, 5% de carboidratos e 20% de lipídios.

Seu genoma consiste de três segmentos de RNA de fita simples denominados de S RNA (small), M RNA (medium) e L RNA (large) que codificam cinco fases abertas de leitura (open reading frames - ORFs). Tanto o M RNA quanto o S RNA possuem duas ORFs em orientação ambisense separados por uma região intergênica (IRG). A ORF da fita viral no sentido senso do M RNA codifica uma proteína não-estrutural (NSm) envolvida no movimento celular viral à curta distância (célula à célula). Já o ORF da fita viral complementar codifica a proteína precursora das glicoproteínas Gn e Gc, localizadas na membrana da partícula viral e que são importantes para a transmissão desses vírus por tripses de modo circulativo e propagativo (Wijkamp et al. 1993). A ORF da fita viral senso do S RNA codifica a proteína não-estrutural NSs identificada como supressora de silenciamento gênico e a ORF da fita complementar codifica a proteína N que da origem ao nucleocapsídeo viral. O segmento L tem a polaridade completamente negativa e contém uma ORF na fita viral complementar que codifica para uma RNA polimerase dependente de RNA (de Haan et al., 1991), como pode ser visualizado na figura 1. Esta proteína está envolvida em várias atividades enzimáticas como a de transcriptase, nuclease e replicase (Adkins et al., 1995; Van Knippenberg et al., 2002; Chapman et al., 2003). O terminal 5' do RNA viral (AGAGCAAU...) é conservado e

complementar ao terminal 3'(UCUCGUUA...), formando assim uma estrutura pseudocircular, não covalentemente fechada, chamada de “panhandle structure”(“estrutura em cabo de panela”).

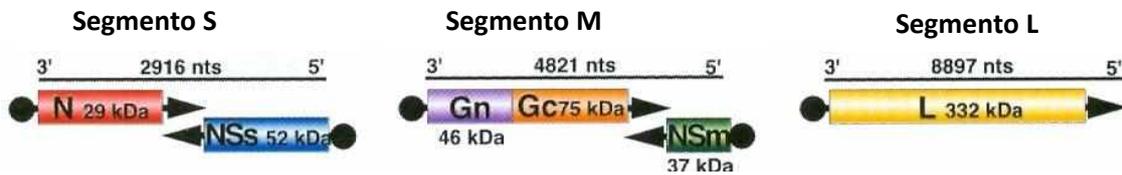


Figura1- Organização dos segmentos genômicos de *Tospovirus*. Linhas escuras acompanhadas 3'e 5'representam as sequências genômicas do vírus. Os mRNAs são demonstrados abaixo, • representa o início 5'de cada ORF. O produto gênico com seu tamanho (kDa) é representado pelos retângulos sólidos (modificado de Elliott, 1996).

As etapas de infecção de bunyavírus animais ocorrem no citoplasma, sendo compostas de vários estágios: interação de uma ou mais proteínas integradas ao envelope viral com receptores do hospedeiro; entrada por endocitose e desencapsidação, fusão da membrana viral com a membrana endossomal; transcrição primária e síntese de mRNA do segmento L utilizando da maquinaria da célula; tradução do mRNA dos segmentos L e S por ribossomos livres no citossol; tradução do segmento M e glicosilação das proteínas do envelope; co-tradução e clivagem do precursor da Gn e Gc; síntese e encapsidação do genoma viral; replicação do genoma; transcrição secundária (espécie com genoma ambisenso); morfogêneses incluindo acumulação de Gc e Gn no complexo de Golgi, glicosilação dos terminais, aquisição e modificação da membrana do hospedeiro e por fim, fusão da vesícula citoplasmática com a membrana plasmática e liberação das partículas virais maduras (Fauquet et al., 2005). (Estas etapas estão presentes em vírus da família *Bunyaviridae* em *Tospovirus* há similaridade em alguns pontos)

Atualmente, o gênero *Tospovirus* compreende oito espécies oficialmente reconhecidas pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) e onze espécies tentativas (Fauquet et al., 2005). As espécies aceitas são: *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Groundnut yellow spot virus* (GYSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) e onze espécies tentativas, entre as mais representativas: *Capsicum*

chlorosis virus (CaCV), Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), Iris yellow spot virus (IYSV), Groundnut chlorotic fan-spot virus (GCFSV), Physalis severe mottle virus (PhySMV) e Watermelon bud necrosis virus (WBNV).

A principal característica na demarcação das espécies foi definida baseada na percentagem de identidade de aminoácidos da proteína N. Valores abaixo de 90% demarcam uma diferente espécie (Goldbach & Kuo, 1996). Além dessa característica molecular, outros fatores biológicos tais como sorologia, círculo de hospedeiros e espécies de tripes vetor e eficiência de transmissão são importantes critérios na classificação dos *Tospovirus*.

Os *Tospovirus*, com base no alinhamento múltiplo dos aminoácidos da proteína N e NS_M, observando a homologia presente nas sequências, foram tentativamente divididos em dois grandes grupos (figura 2), os *Tospovirus* do grupo Americano e os *Tospovirus* do grupo Euro-Asiático. Dentro do grupo Americano encontram-se TSWV, INSV, GRSV, TCSV, CSNV, ZLCV e Peanut yellow spot vírus (PYSV).

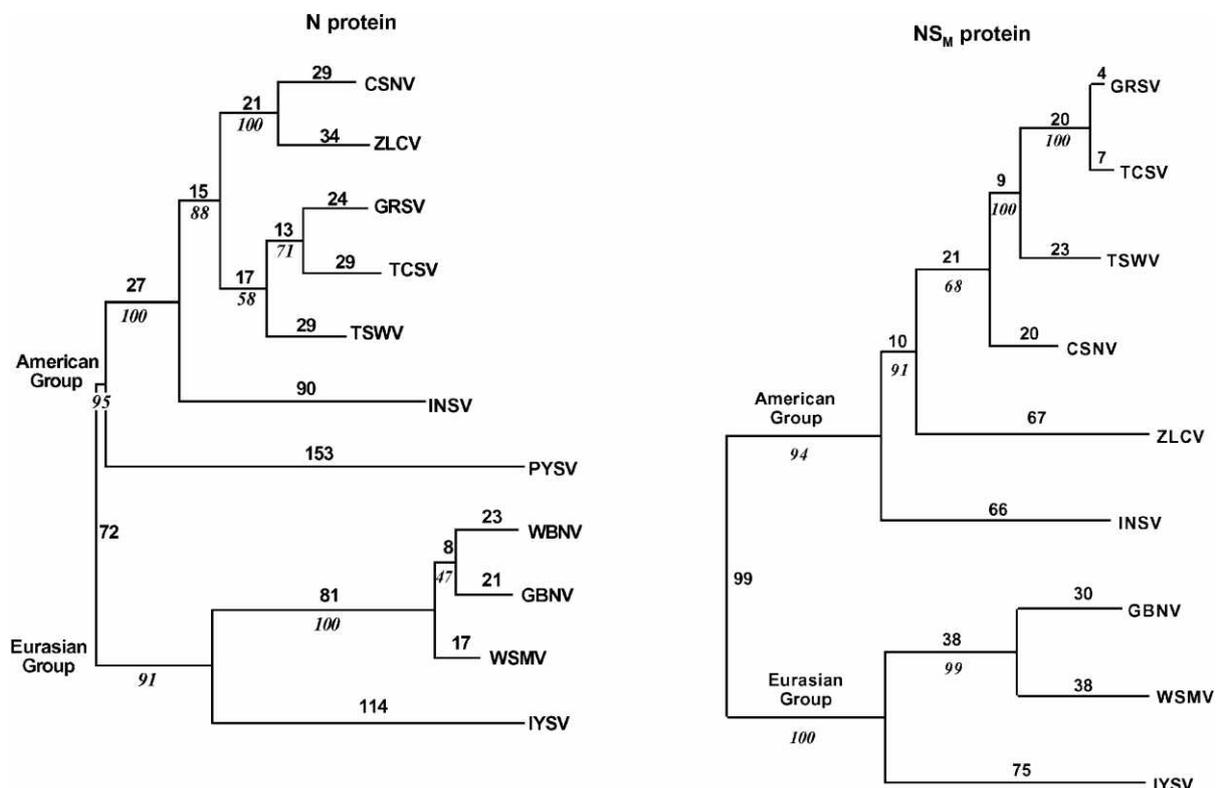


Figura 2- Árvores filogenéticas das espécies de *Tospovirus* baseado nas sequências de aminoácidos que codificam as proteínas N e NS_M. Fonte: Silva et al., 2001. Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Tomato chlorotic spot virus (TCSV), Groundnut ringspot virus (GRSV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), Iris yellow spot virus (IYSV), Melon yellow spot virus (MYSV), Watermelon silver mottle virus (WSMoV), Groundnut bud necrosis virus (GBNV) e Peanut yellow spot virus (PYSV).

O grupo Euro-Asiático é composto por Iris yellow spot virus (IYSV), WSMV, GBNV e WBNV. A semelhança entre as árvores filogenéticas derivadas das proteínas NSm e N sugere que ambas as proteínas podem refletir a evolução das espécies de *Tospovirus* em diferentes regiões geográficas (Silva et al., 2001).

Em relação ao vetor tripses, os *Tospovirus* apresentam um tipo de relação circulativa e propagativa (Wijkamp et al., 1993), as partículas virais são adquiridas no primeiro instar larval do inseto durante a alimentação em plantas hospedeiras infectadas e é transmitido pelas larvas e/ou tripses adultos virulíferos quando se alimentam de hospedeiras sadias (Van de Wetering et al., 1996). Cerca de 520 espécies de tripses ordenadas em 139 gêneros e seis famílias são conhecidas no Brasil (Monteiro et al., 2001). Cinco espécies são encontradas no Brasil, entre elas: *Frankliniella occidentalis* Pergande, *Frankliniella schultzei* Trybom, *Frankliniella zucchini* (Nakahara & Monteiro, 1999), *Thrips tabaci* Lindeman e *Thrips palmi* Karny. As principais espécies de tripses vetores mais encontradas no Brasil são: *F.occidentalis* e *F. schultzei*, (Nagata et al., 1999).

A típica expressão de sintomas desenvolvidos pelas espécies do gênero *Tospovirus* são necroses nos pecíolos, anéis necróticos em frutos e anéis cloróticos e bronzeamento nas folhas, diminuição na produção de frutos, nanismo da planta, o encarquilhamento da folha, o qual é evidente nos sintomas causados por ZLCV. O espectro de hospedeiras das espécies do gênero é bastante amplo como exemplo, TSWV infecta mais de 950 espécies de plantas compreendendo mais de 70 famílias botânicas, sendo disseminado em todos os continentes (Peters 1998). Avaliando o grupo Americano, a maioria dos vírus apresentam um círculo de hospedeiras amplo abrangendo várias famílias botânicas, exceto ZLCV e INSV, que apresentam uma restrição nesse aspecto. ZLCV infecta, basicamente, cucurbitáceas e algumas solanáceas (Bezerra et al, 1999).

3 - *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), Aspectos Gerais.

O vírus *Zucchini lethal chlorosis virus* como espécie membro pertencente ao gênero *Tospovirus* apresenta características estruturais semelhantes àquelas das outras espécies do gênero, como partícula esférica envelopada de aproximadamente 80 a 90 nm em diâmetro, seu genoma é tri-segmentado (segmentos L, M e S). Possui, no entanto, algumas características peculiares como círculo de hospedeiras restrito (Bezerra et al., 1999, Resende et al 1997 e Rezende et al., 1995) e é transmitido exclusivamente pela espécie reconhecida recentemente de tripes proposta como *Frankliniella zucchini*.

O *Tospovirus* ZLCV provavelmente foi relatado no Brasil nos anos 70 e 80, mas ainda não identificado como ZLCV, em relatos de incidência de infecção viral em cucurbitáceas (Kitajima & Costa, 1972; Cupertino et al., 1984 e Silveira Jr. et al., 1985), sendo a doença caracterizada neste período como infecção por TSWV. Estudo posterior de Resende et al., (1996) avaliaram por método sorológico e DAS-ELISA, que em 60 amostras de diferentes culturas com sintomas típicos de *Tospovirus*, provenientes de seis estados distintos, 46% eram TSWV, 36% TCSV, 12% GRSV e 10 % das amostras testadas não demonstraram qualquer reação com os anti-soros utilizados. Com base nesses resultados, produziu-se anti-soros específicos para os isolados distintos e foi possível constatar a existência de três novos sorogrupos, que potencialmente, representavam três novas espécies do gênero *Tospovirus*. Dois desses isolados (Chry 1 e BR-11t) posteriormente foram caracterizados como CSNV e ZLCV, respectivamente (Bezerra et al., 1997).

A nova espécie ZLCV foi caracterizada com base na análise de identidade da sequência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína N, pela reação sorológica, espectro de hospedeiras e vetor transmissor. Na análise da identidade da sequência de aminoácidos da proteína N, observou-se maior identidade do ZLCV com CSNV 80% seguida por GRSV 75%, TCSV 73%, TSWV 72% e menor identidade com *Peanut yellow spot virus* (PYSV) 20%. No aspecto sorológico, com base em anticorpos policlonais, não foi observada nenhuma reação cruzada significativa.

Sobre o vetor transmissor, no trabalho de Bezerra et al., (1999), não foi identificado à espécie de tripes responsável pela transmissão do ZLCV,

utilizando-se as espécies de tripes mais comum no Brasil. No entanto, Nakahara & Monteiro (1999), identificaram uma nova espécie denominada de *Frankliniella zucchini* e através de testes de transmissão desenvolvidos pelo Dr. Jorge Rezende da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), (comunicação pessoal) em regiões de produção de cucurbitáceas em Piracicaba-SP, demonstraram *F. zucchini* como sendo o agente responsável pela transmissão do ZLCV.

Os estudos biológicos com a nova espécie demonstraram que o espectro de hospedeiras do ZLCV é restrito em comparação com o observado nos demais *Tospovirus*, ZLCV apenas infectou solanáceas causando lesões clorótica em *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana occidentalis*, além de mosaico e redução de crescimento em *N. benthamiana*. Também foi observada a infecção de *Gomphrena globosa* desenvolvendo lesão clorótica e sintomas sistêmicos. Em cucurbitáceas, principalmente em melancia (*Citrullus lanatus*), o ZLCV causou sintomas de clareamento de nervuras, mosaico, deformação da folha, chegando até a morte da planta. Em melão (*Cucumis sativus*), o vírus induziu clareamento das nervuras e mosaico e em abobrinha (*Cucurbita pepo* e *Cucurbita melo*) causou sintomas como mosaico, redução de crescimento, deformação foliar e morte da planta. Resende et al., (1996) em ensaios de casa de vegetação, verificaram que ZLCV infectou membros da família *Amaranthaceae*, *Solanaceae* e *Cucurbitaceae* relatando uma nova hospedeira, *Capsicum annuum* e *Capsicum chinensis* PI 159236. Já Rezende et al. (1995) testaram a transmissão do ZLCV para 21 espécies de plantas através de inoculação mecânica e observaram sintomas locais em *Nicotiana tabacum* “TNN”, *N. tabacum* “Turkish” e *Datura stramonium*. Em testes complementares com cucurbitáceas não foi identificado a presença do ZLCV em variedades de melancias e abóbora, tais como melancia “Charleston Gray”, Abóbora “Menina Brasileira” e Abóbora Híbrida “Tetsukabuto” (Rezende et al., 1997).

Os sintomas mais evidentes em cucurbitáceas apresentados pela infecção com ZLCV podem incluir clorose e necrose sistêmica em folhas, enrolamento da folha apical, redução do limbo foliar, malformação dos frutos, escurecimento da casca e nanismo da planta (Giampan et al., 2007).

A reação de diferentes espécies de cucurbitáceas a infecção natural por ZLCV foi avaliada em experimentos conduzidos na ESALQ, onde foram

utilizadas diferentes cultivares de cucurbitáceas: Menina Brasileira, Moranga Exposição, Abóbora Híbrida do tipo “Tetsukabuto”, Abóbora Rasteira, Pepino Safira, Abóbora Híbrida da Moita “Caserta”, Melancia “Crimson Sweet”, e Maxixe do Norte. A Abobrinha Híbrida e a abobrinha da Moita “Caserta” demonstraram alta suscetibilidade. Maxixe do Norte, Melancia “Crimson Sweet” e Abóbora Rasteira apresentaram uma baixa suscetibilidade, enquanto Moranga exposição, não apresentou nenhuma planta infectada. Esses resultados foram observados tanto em infecção natural como em inoculação mecânica, surgindo, dessa forma, a primeira fonte de resistência para ZLCV (Giampan et al., 2007).

Os danos provocados às culturas de cucurbitáceas por ZLCV vêm aumentando após sua caracterização até os dias de hoje, como foi relatado por Giampan et al., (2009), os quais avaliaram os danos sobre a produção de frutos comercializáveis de Abobrinha da Moita “Caserta”. Observou-se a redução de 78% da produção de frutos com 42 dias após a emergência da planta. Rezende et al., (1997) também já havia relatado o efeito danoso do ZLCV sobre *Cucurbita pepo* cv. “Caserta”. Devido aos danos observados no campo, o ZLCV demonstra ser um *Tospovirus* de importância significativa para várias espécies de cucurbitáceas.

A variação da incidência do ZLCV pode ser constatada nos trabalhos de Rezende et al., (1995, 1997), que relatam a ocorrência de viroses em cucurbitáceas em vários estados do Brasil. Esses autores observaram uma ampla incidência do ZLCV em plantações de abobrinha no Estado de São Paulo com ocorrência em cerca de 50,6 % das áreas avaliadas. Em outro trabalho, onde foi avaliada a incidência de cinco espécies virais em cucurbitáceas produzidas em regiões agrícolas do Estado de São Paulo, demonstrou-se a prevalência de *Papaya ringspot virus* tipo W (PRSV-W). *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), com 49,1% e 24,8% respectivamente, seguido por ZLCV com 7,8% (Yuki et al., 2000).

Em um estudo posterior de incidência viral no estado do Mato Grosso do Sul verificaram que os vírus mais predominantes foram PRSV-W, ZLCV e ZYMV com incidência média de 63,4%; 56,1% e 41,4% respectivamente (Stangarlin et al., 2001), ZLCV também foi detectado no Distrito Federal infectando a cultura de pepino (Nagata et al., 1998).

A distribuição geográfica do ZLCV no maior estado produtor de cucurbitáceas no Brasil está demonstrada na figura 3 (Yuki et al., 2000. Com adaptações). Essa figura foi obtida do trabalho de Yuki et al., (2000), os quais avaliaram a incidência e distribuição de 5 espécies virais (CMV, PRSV-W, WMV2, ZLCV e ZYMV) no maior estado produtor de cucurbitáceas. Das 40 regiões observadas foi encontrado vírus que infectam cucurbitáceas em 38 regiões, sendo que ZLCV, a sua presença foi observada em 21 das 40 regiões produtoras de cucurbitáceas, ficando atrás de PRSW-W e ZYMV, vírus com maior incidência e distribuição, respectivamente.

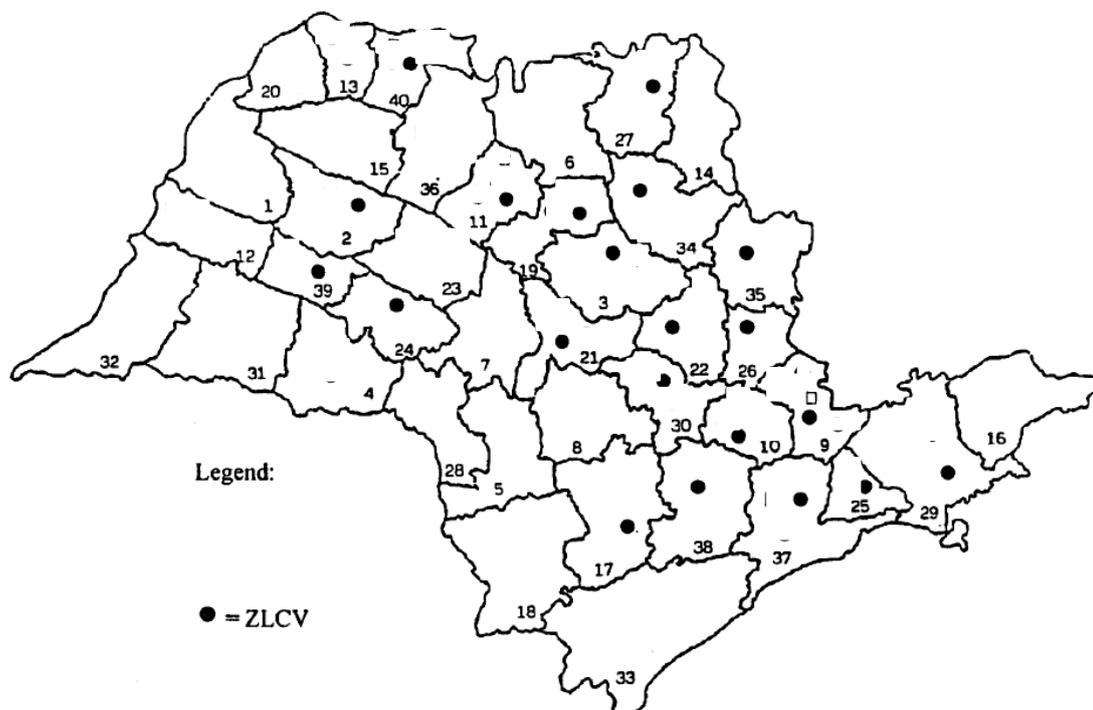


Figura 3 - Mapa do estado de São Paulo indicando a distribuição do ZLCV em espécies de cucurbitáceas em 21 de 40 regiões produtoras. 1 Andradina; 2 Araçatuba; 3 Araraquara; 4 Assis; 5 Avaré; 6 Barretos; 7 Bauru; 8 Botucatu; 9 Bragança Paulista; 10 Campinas; 11 Catanduva; 12 Dracena; 13 Fernandópolis; 14 Franca; 15 General Salgado; 16 Guaratingueta; 17 Itapetininga; 18 Itapeva; 19 Jaboticabal; 20 Jales; 21 Jaú; 22 Limeira; 23 Lins; 24 Marília; 25 Mogi das Cruzes; 26 Mogi Mirim; 27 Orlandia; 28 Ourinhos; 29 Pindamonhangaba; 30 Piracicaba; 31 Presidente Prudente; 32 Presidente Venceslau; 33 Registro; 34 Ribeirão Preto; 35 São João da Boa Vista; 36 São José do Rio Preto; 37 São Paulo; 38 Sorocaba; 39 Tupã; e 40 Votuporanga.

A caracterização molecular do ZLCV, até o momento, apenas as proteínas estruturais N (Bezerra et al., 1999), glicoproteínas Gn e Gc (Nagata et al., 2007) e a proteína não estrutural NSm (Silva et al., 2001) estão totalmente caracterizadas, faltando apenas a proteína supressora de silenciamento gênico NSs e a polimerase viral, proteína L, para a total caracterização molecular da espécie. Gn, Gc e a NSm são candidatas como parâmetro adicional para a classificação de espécies do gênero *Tospovirus*, devido a semelhança entre as árvores filogenéticas geradas na comparação dessas proteínas entre as espécies virias que formam os grupos Americano e Euro-Asiático de *Tospovirus*. (Silva et al., 2000, Nagata et al., 2007).

4 - Aspectos Sorológicos do Gênero *Tospovirus*

Inicialmente a distinção entre as espécies no gênero *Tospovirus* era feita com base na reação sorológica (De Ávila et al., 1993 A), atualmente esta distinção é feita principalmente com base na identidade de aminoácidos da proteínas do nucleocapsídeo viral (De Ávila et al., 1993 B). Características fenotípicas, citopatológicas, composição do nucleocapsídeo, tamanho do segmento de RNA são gênero específicas, ou seja, possíveis de serem utilizadas para separar gêneros, não podendo ser usadas para definir espécies dentro do gênero (De Ávila et al., 1993). Trabalhos como de Wang (1990) usou a sorologia para comparar e separar 30 isolados de TSWV através de técnicas de ELISA. Dekker et al., (1989), também empregaram da mesma ferramenta para estudar a relação sorológica entre isolados de TSWV, utilizando de cinco diferentes procedimentos de ELISA. Com base nas diferenças antigênicas entre as proteínas do nucleocapsídeo de diferentes vírus, usando de anti-soros monoclonais e policlonais, foi proposto o agrupamento dos *Tospovirus* em sorogrupos e sorotipos (De Ávila et al., 1990).

De Ávila (1992) estudando diversos isolados de várias origens geográficas, caracterizou espécies de *Tospovirus* com base no seu aspecto sorológico. Em relação aos sorogrupos, o vírus TSWV, isolado BR-01 foi adicionado ao sorogrupo I, os atuais *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Groundnut ringspot virus* (GRSV), denominados inicialmente isolados BR-03 e SA-5 respectivamente, foram adicionados ao sorogrupo II e INSV ao sorogrupo

III (De Ávila et al., 1993). GBNV, WBNV e WSMV estão alocados no sorogrupo IV. Durante as comparações sorológicas é possível identificar uma reação sorológica cruzada entre o sorogrupo I e II, o que não ocorre em relação ao sorogrupo III. Neste trabalho, a ausência de reação cruzada entre a proteína N do isolado NL-07 (sorogrupo III) com os isolados BR-01 (sorogrupo I) e SA-5 (sorogrupo II) sugeriram uma larga divergência entre as proteínas do nucleocapsídeo desses vírus, dando suporte para considera-los espécies diferentes (De Ávila et al., 1993).

No sorogrupo II, existem dois sorotipos, os isolados BR-03 e SA-05, mas devido à proximidade entre os isolados só foi possível a distinção entre as espécies com base na análise molecular da proteína N dos vírus. As glicoproteínas também podem ser utilizadas para a diferenciação com base em anti-soros monoclonais (Adam et al., 1993), contudo, no trabalho de Ávila et al., (1993), foi possível constatar com a técnica de “immunogold decoration of the virus particles” que as glicoproteínas são mais conservadas do que a proteína do nucleocapsídeo nos *Tospovirus*, similar conclusão foi obtida por Law et al., (1991). Outros trabalhos realizados concluíram a distinção sorológica das espécies agrupadas em sorogrupos. Esses resultados demonstram que a proteína do nucleocapsídeo não é extremamente conservada e, portanto, servindo como base molecular para a diferenciação molecular das espécies virais no gênero *Tospovirus*.

Os vírus CSNV e ZLCV (isolados Chry 1, BR-09z que são CSNV e ZLCV respectivamente) com base no estudo de reação cruzada utilizando anticorpos policlonais contra GRSV, TCSV, TSWV e isolado BR-11t demonstraram uma leve reação cruzada com os vírus do sorogrupo I e II, através do método de DAS-ELISA e Western Blotting, porém, não significativa, desta forma, foram classificados como dois novos sorogrupos (Resende et al., 1996).

Para a diagnose viral, resultados sorológicos são confiáveis de acordo com De Ávila et al., (1993), pelo fato de não ter sido observado mudança nos resultados sorológicos, após várias passagens de diferentes vírus por inoculação mecânica. Levando em conta esses aspectos, a sorologia continua sendo uma ferramenta de grande valia para a diagnose de *Tospovirus*, tendo como vantagem, o custo benefício, sendo uma técnica bem mais econômica que a diagnose molecular. Entretanto, apresenta como desvantagem, não ser tão sensível

como as técnicas moleculares e também pelo fato, dentre os *Tospovirus*, de existir reação cruzada observada entre algumas espécies dentro do gênero, como foi observado entre ZLCV com GRSV e TCSV e de GRSV com TSWV, TCSV e ZLCV (dados não apresentados).

5 - Proteína Supressora de Silenciamento Gênico em *Tospovirus*, NSs.

A proteína NSs tospoviral localiza-se no segmento S do genoma viral. Sua ORF apresenta aproximadamente 1400 pb variando em tamanho em poucos nucleotídeos de acordo com a espécie. A proteína, contém aproximadamente 468 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 52 kD. Na família *Bunyaviridae*, os gêneros que apresentam a ORF correspondente a proteína supressora do silenciamento são *Orthobunyavirus* (NSs de orientação senso com peso molecular de 11 kD) e *Phlebovirus* (de orientação ambisenso com peso molécula de 32 kD). Os gêneros *Hantavirus* e *Nairovirus* não apresentam no seu genoma a ORF correspondente a proteína NSs (Fauquet et al., 2005).

O fenômeno de silenciamento gênico de RNA foi primeiramente identificado por dois pesquisadores (Napoli et al., 1990; Van Der Krol et al., 1990) com a construção de planta transgênica de petúnia, cujas flores demonstravam uma coloração mais intensa. A estratégia tinha como base, super-expressar o gene da chalcone sintase (CHS). A metodologia constituiu-se na introdução de uma cópia desse gene na planta para intensificar a coloração das flores, contudo, o resultado obtido foi inesperado, ao invés do aumento da expressão de antocianinas, caracterizando um aumento da coloração das flores, houve a diminuição da sua coloração, ou seja, a falta do pigmento. Com a análise molecular das plantas, observou-se que a introdução da cópia gênica havia bloqueado a biossíntese do pigmento. O fenômeno foi chamado de co-supressão, pois a introdução de um gene transgênico levou ao silenciamento do próprio gene endógeno.

Estudos posteriores demonstraram que a presença de moléculas de dsRNA (RNA dupla fita) era o precursor para desencadear o processo de silenciamento gênico (Guo & Kempf, 1995).

O processo de silenciamento gênico refere-se a uma série de mecanismos por meio do qual a expressão de um ou mais genes é regulada

negativamente, ou seja, regulação da super-expressão de um gene. A expressão é regulada pelo silenciamento gênico via atuação da enzima DICER, processo no qual, RNAs dupla fita (dsRNA) são degradados formando pequenos RNAs interferentes de 21-26nt (siRNA) que servem de precursor para atuação do complexo RISC que age degradando RNAs homólogos aos que deram origem aos dsRNAs (Fire et al., 1999).

Pela sua forma de ação, o silenciamento gênico constitui-se também, em uma ferramenta de defesa da planta contra infecções virais. Muitos estudos estão sendo feitos com a construção de plantas transgênicas que carregam segmentos de vírus que são capazes, após uma infecção viral, de desencadear o processo de silenciamento gênico. Como, por exemplo, o trabalho de Hassani-Mehraban et al., (2009) que construíram uma fita cassete quimérica com sequências genômicas de 5 espécies de *Tospovirus* e agro-infectaram em *Nicotiana benthamiana*, o qual foi observado resistência ampla a diferentes espécies de *Tospovirus*.

A mesma “capacidade” que a planta tem de evitar a infecção viral, o vírus tem de burlar o mecanismo de defesa da planta. A supressão do silenciamento gênico é uma forma pela qual o vírus tem de suprimir a defesa da planta. A primeira evidência da NSs de *Tospovirus* como proteína supressora do silenciamento gênico foi obtida com a construção de um transgene (vetor) expressando GFP e a NSs de TSWV. Através da agroinoculação simultânea das duas construções mencionadas em *N. benthamiana*, foi possível suprimir o silenciamento da expressão de GFP e interferir no acúmulo de siRNA. Este resultado sugeriu que a NSs interfere principalmente com a etapa que inclui a formação de RNAs dupla fita durante o processo de silenciamento gênico em plantas (Takeda et al., 2002).

O mecanismo de supressão de silenciamento gênico tem como base vias de atuação, sendo que uma via de atuação já está bem elucidada: a inibição do metabolismo de RNA interferentes (RNAi), com o sequestro de RNAi bloqueando sua atuação (Fire et al., 1999). Diversos trabalhos estão sendo realizados visando o entendimento da atuação da NSs na supressão do silenciamento gênico, através de táticas de co-inoculação de um isolado viral infectivo e outra não infectivo (Hassani-Mehraban et al., 2009). Também, estudo dos mecanismos de silenciamento vem sendo conduzidos, através da construção

de vetores que expressam a proteína supressora do silenciamento gênico, sendo estes co-inoculados com a estirpe viral, na qual é avaliada a atuação da proteína NSs (Hassani-Mehraban et al., 2009).

Além dos *Tospovirus*, outros vírus de planta também apresentam proteínas que agem na supressão do processo de silenciamento gênico pós transcricional. A proteína 2b de *Cucumber mosaic virus* (CMV), proteína 19k (p19) de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), HC-Pro de *Tobacco etch virus* (TEV), são exemplos efetivos da ação de proteínas supressoras de silenciamento gênico (Brigneti et al., 1998, Li et al., 2002).

6 - Filogenia, Identidade e Análise de Domínios Protéicos do Gênero *Tospovirus*.

A filogenia com base na identidade de sequências é comumente utilizada para levantar hipóteses de relação evolutiva, ou seja, determinar as relações ancestrais entre espécies conhecidas. Diversos métodos foram desenvolvidos para deduzir filogênese como, por exemplo, teste Neighbor-joining, Parcimônia Máxima, Verossimilhança, Interferência Bayesiana, entre outros.

A definição de vários grupos taxonômicos é sugerida com base na análise filogenética do seu genoma, no âmbito da virologia é comumente observada à relação filogenética, tendo como base para as análises, as proteínas mais conservadas, como por exemplo, a proteína do nucleocapsídeo viral. Na família *Bunyaviridae*, as espécies do gênero *Tospovirus* foram agrupadas com base em análises filogenéticas da sequência de aminoácidos da proteína N e NSm. A principal característica na demarcação das espécies está na porcentagem de identidade de aminoácidos da proteína N. Valores abaixo de 90% demarcam uma diferente espécie (Goldbach & Kuo, 1996), contudo, com base na análise filogenética levando em conta a identidade de aminoácidos das proteínas NSm e Gn, Gc, estas foram sugeridas como um adicional na classificação das espécies do gênero *Tospovirus* (Silva et al., 2001; Nagata et al., 2007).

Silva et al., (2001) com a construção de árvores filogenéticas (figura 2), diferenciou as espécies do gênero *Tospovirus* em dois grandes grupos, o grupo

Americano e o grupo Euro-Asiático, tendo como base para a análise, o alinhamento dos aminoácidos da proteína N e da proteína NSm. O resultado obtido com avaliação filogenética e de identidade dos aminoácidos, em um comparativo entre as proteína N e NSm, foi proposto que a proteína de movimento dos *Tospovirus* poderia ser utilizada como um fator adicional para a classificação taxonômica, levando em conta a separação de espécies do gênero *Tospovirus*. A porcentagem de identidade de aminoácidos da NSm, observada no trabalho, variou do máximo de identidade de 96.7% entre GRSV e TCSV e o mínimo de identidade de 34% entre ZLCV e IYSV.

Análise semelhante foi realizada tendo como base as sequências de aminoácidos das glicoproteínas dos *Tospovirus* (Nagata et al., 2007). Foi montada uma árvore filogenética (Figura 4) com o alinhamento das sequências de aminoácidos das glicoproteína das espécies de *Tospovirus* conhecidas e observou-se uma relação filogenética muito parecida com a mesma análise feita por Silva et al., (2001) com as proteínas NSm e N. A árvore montada, também agrupou as espécies de *Tospovirus* em dois grandes grupos: Americano e Euro-Asiático. Como no trabalho de Silva et al., (2001), também foi proposto que as glicoproteínas poderiam ser usadas como um fator adicional para a separação de espécies dentro do gênero *Tospovirus*. Os dados apresentados pela porcentagem de identidade da proteína G foi muito parecido com a identidade observada na NSm. Os valores obtidos para G mostraram que a maior identidade foi identificada entre GRSV e TCSV (96%) e a menor identidade entre ZLCV e IYSV (35%).

Análises de nucleotídeos da região intergênica (IGR) do segmento S e M demonstraram uma porcentagem de identidade dessas regiões no segmento S, entre diferentes espécies, de 42 a 57%, enquanto que para isolados da mesma espécie foi de 79 a 99%. Para a região IGR do segmento M, o valor observado entre espécies diferentes foi de 46 a 59% e entre isolados de 84 a 98%. Estes dados indicaram que a divergência de sequência observada na região IGR é semelhante à identidade observada no gene do nucleocapsídeo, em nível de inter e intra-espécies (Pappu et al., 2000).

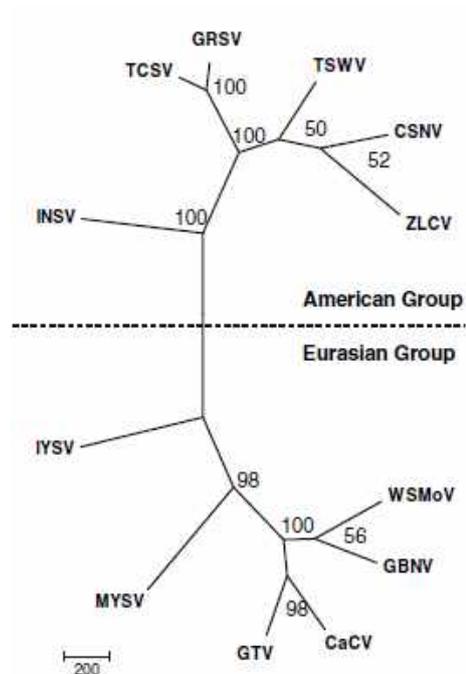


Figura 4: Árvore filogenética baseada em sequências de aminoácidos precursores da proteína G. Fonte Nagata et al., (2007). Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Melon yellow spot virus* (MYSV), *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), *Gloxinia Tospovirus* (GTV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), e *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV).

OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral aprofundar o conhecimento biológico e molecular da espécie *Zucchini lethal chlorosis virus*, que ocorre exclusivamente no Brasil, infectando preferencialmente cucurbitáceas. O trabalho visou refazer o espectro de hospedeiras do ZLCV com a ampliação do número de espécies testadas principalmente dentro das famílias *Cucurbitaceae* e *Solanaceae*, buscando, dessa forma, um entendimento mais amplo da diversidade e/ou estabilidade genética do ZLCV. No aspecto molecular visou a caracterização da proteína NSs, supressora de silenciamento gênico que pode estar potencialmente envolvida na interação vírus/hospedeiro. Visou ainda, a produção de um anti-soro policlonal para a detecção em larga escala do vírus.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o espectro de plantas hospedeiras do ZLCV em espécies de seis famílias botânicas,
- Produzir anti-soro contra a proteína do nucleocapsídeo do ZLCV,
- Avaliar a especificidade do anti-soro com outras espécies de *Tospovirus* do grupo Americano (TSWV, TCSV e GRSV),
- Sequenciar e caracterizar a proteína NSs do ZLCV,
- Analisar a identidade de aminoácidos da proteína NSs do ZLCV com os demais *Tospovirus*,
- Avaliar a filogenia dos *Tospovirus* com base na proteína NSs,
- Analisar comparativamente os domínios da proteína NSs dos *Tospovirus* e sua relação com outras proteínas não estruturais de dois gêneros da família *Bunyaviridae*: *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus* que também apresentam no seu genoma a ORF NSs.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Estudos Biológicos

1.1 - Obtenção do Isolado do ZLCV

O isolado do ZLCV foi gentilmente concedido pelo Professor Jorge Marques Rezende da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) Piracicaba, SP. Na obtenção do isolado, plantas de Abobrinha da Moita “Caserta” naturalmente infectadas com ZLCV foram coletadas em áreas produtoras do estado de São Paulo, onde o vírus apresenta alta incidência. A transmissão do vírus para plantas sadias de *Cucurbita pepo* cv. “Caserta” foi feita por tripes, em casa de vegetação e após a manifestação de sintomas sistêmico na planta, amostras foram testadas em DAS-ELISA (Double antibody sandwich - “*Enzime Linked Immunosorbent Assay*”) de acordo com protocolo de Clark & Adams (1997). Foram utilizados anticorpos policlonais contra os *Tospovirus* TSWV, GRSV, TCSV, CNSV e ZLCV, contra os *Potyvirus* ZYMV, PRSV-W, PVY, WMV II e contra o *Cucumovirus* CMV. Para a verificação apenas da presença do ZLCV na planta infectada.

1.2 - Manutenção e Multiplicação do Isolado do ZLCV

Inicialmente foi tentado propagar o isolado do ZLCV na sua hospedeira natural, a abobrinha da moita “Caserta”, mas devido dificuldades de infecção do vírus, este foi multiplicado e mantido em plantas de *Datura stramonium* e *Nicotiana benthamiana* em casa de vegetação da Embrapa Hortaliças, DF. Extrato de plantas de *C. pepo* cv. “Caserta” sintomáticas infectadas com ZLCV foi preparado pela maceração de folhas em tampão de inoculação (fosfato de sódio 0,01M + sulfito de sódio 1%, pH ajustado para 7,0), e mecanicamente inoculado em plantas previamente polvilhadas com carbureto de silício (400 mesh) como abrasivo (De Ávila et al., 1993). A inoculação do isolado para novas plantas foi realizado a cada três semanas para sua manutenção em casa de vegetação. Amostras de folhas sintomáticas de *Datura stramonium* foram estocadas no freezer -80°C para a preservação do isolado do ZLCV.

1.3 - Espectro de Plantas Hospedeiras

O estudo do círculo de plantas hospedeiras do ZLCV foi conduzido em ensaio realizado sob condições controladas, em casa de vegetação. No experimento foram avaliadas 23 diferentes plantas de cucurbitáceas (variando entre espécies e cultivares) e 18 diferentes plantas de solanáceas (também variando entre espécies e cultivares), além de espécies de plantas de mais quatro famílias botânicas (tabela 1). Foi dada ênfase maior nessas duas primeiras famílias botânicas devido a restrição do vírus em infectar outras família de plantas (Bezerra et al., 1999; Rezende et al., 1995, 1997; Resende et al., 1996) .

Para cada cultivar avaliada, foram preparadas 12 vasos de 300 ml de capacidade contendo solo autoclavado (120 °C/ 1 hora) e duas plantas por vaso. Vinte plantas (= 10 vasos) foram inoculadas com o vírus e quatro plantas (= 2 vasos) foram mantidas como controle negativo, sendo inoculadas apenas com tampão. Como controle positivo utilizou-se *D. stramonium* e *N. benthamiana*, sensíveis ao ZLCV. O inóculo foi preparado a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas com ZLCV.

As plantas-testes foram inoculadas em duas etapas para garantir maior eficiência de inoculação, sendo a primeira no estágio cotiledonar, cinco dias após a emergência e a segunda, quatro dias após a primeira inoculação. O inóculo foi preparado na proporção de 1 grama de folha infectada para 10 ml de tampão de inoculação (fosfato de sódio 0,01M + sulfito de sódio 1%; pH 7,0), antes da inoculação as plantas foram polvilhadas com carbureto de sílica (400 mesh) como abrasivo (De Ávila et al., 1993).

A expressão de sintomas nas plantas inoculadas foi avaliado inicialmente 15 dias após segunda inoculação. Os sintomas avaliados foram: Reação de Hipersensibilidade (RH), Lesão clorótica (LC), lesão necrótica (LN), mosaico (M), clorose (C), deformação foliar (DF), morte da planta (MP), redução do crescimento (RC), clareamento de nervuras (CN), embolhamento foliar (EB), encarquilhamento foliar (EF), necrose foliar (NF) e sem sintomas (...).

Plantas avaliadas

| <i>Cucurbitaceae</i> | <i>Solanaceae</i> | <i>Fabaceae</i> | <i>Chenopodiaceae</i> | <i>Amaranthaceae</i> | <i>Convolvulaceae</i> |
|---|---|------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Casca Grossa" | <i>Datura stramonium</i> | <i>Phaseolus</i> sp. | <i>Chenopodium amaranticolor</i> | <i>Gomphrena globosa</i> | <i>Ipomoea setosa</i> |
| <i>Citrullus lanatus</i> Cv. "Rajada" | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>Phaseolus</i> BT2 | <i>Chenopodium quinoa</i> | | |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Moranga Exposição" | <i>Nicotiana tabacum</i> "TNN" | <i>Phaseolus</i> Adzuk | <i>Beta vulgaris</i> | | |
| <i>Cucurbita pepo</i> Cv. "Caserta"/ "Clarinda" | <i>Nicotiana tabacum</i> "Turkish" | <i>Phaseolus</i> Caupi | | | |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Caipira" | <i>Nicotiana benthamiana</i> | <i>Vigna faber</i> | | | |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Menina Brasileira pecoce" | <i>Nicotiana glutinosa</i> | <i>Pisum sativum</i> | | | |
| <i>Citrullus lanatus</i> Cv. "Congo" | <i>Nicotiana rustica</i> | | | | |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. Híbrida | <i>Nicotiana tabacum</i> | | | | |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Verde Comprido" | <i>Nicandra physalodes</i> | | | | |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Sugar Baby" | <i>Physalis occidentalis</i> | | | | |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Manina Creme" | <i>Capsicum chinense</i> PI 159236 | | | | |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Bahiana Tropical" | <i>C. annuum</i> Cv. "Vermelho Gigante" Vermelho Gigante | | | | |
| <i>Cucumis anguria</i> Cv. do Norte | <i>S. lycopersicum</i> Cv. Coração de Boi | | | | |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Menina Brasileira" | <i>C. annuum</i> Cv. "Doce Comprida" | | | | |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Tronco Verde Redonda" | <i>C. annuum</i> Cv. "Italiano Amarelo Gigante" | | | | |
| <i>Cucumis melo</i> Cv. Imperial 45 | <i>C. annuum</i> Cv. "Cambuá Chapéu de Bispo " | | | | |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. Safira | <i>S. lycopersicum</i> Cv. "Cereja Carolina" | | | | |
| <i>Cucumis melo</i> Cv. "Eldorado" | <i>C. annuum</i> Cv. "Yolo Wonder" | | | | |
| <i>Citrullus lanatus</i> Cv. "Charleston Gray" | <i>Solanum gilo</i> Cv. "Redondo Morro Grande" | | | | |
| <i>Citrullus lanatus</i> Cv. "Crimson Sweet" | <i>Abelmoschus esculentus</i> "Santa Cruz 47 chifre de viado" | | | | |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Nova caravela" | | | | | |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Caipira Esmeralda" | | | | | |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Goianinha" | | | | | |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Moranga exposição" | | | | | |

Tabela 1- Plantas utilizadas para o círculo de hospedeiras de *Zucchini lethal chlorosis virus*. ZLCV foi inoculado em espécies de plantas de 6 famílias botânicas e os sintomas foram inicialmente avaliados 15 dias após a Inoculação.

Para detecção do ZLCV nas plantas inoculadas, amostras foram testadas em Dot-ELISA, 30 dias após a segunda inoculação, utilizando-se do anti-soro produzido no presente trabalho. As amostras que reagiram ao anti-soro (dados não apresentados) e que apresentavam sintomas (Anexo Figura 17) extraiu-se RNA total que foi utilizado para a confirmação da presença do vírus através da reação da transcrição reversa e da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR). Na reação utilizou-se o par de primers ZLCV P1 (5'-TCAACCCATAAGCCTGAACC - 3') e ZLCV P2- (5' - TGTTGCTTTGCTGACTCA - 3') que são complementares as posições 614-638 e 274-291 nt, respectivamente) e amplificaram um fragmento de 350 pb (Giampan et al., 2007).

2 - Estudos Sorológicos

2.1 - Multiplicação do Inóculo para Purificação Viral

Para a multiplicação do ZLCV foram inoculadas mecanicamente 100 plantas de *Nicotiana benthamiana*, em casa de vegetação da Embrapa Hortaliças, DF.

2.2 - Purificação Viral

A purificação dos nucleocapsídeos virais do ZLCV foi feita a partir de folhas de *N. benthamiana* infectadas com ZLCV, seguindo o método descrito por De Ávila (1990), Huguenot (1990), com modificações. Cinquenta gramas de folhas exibindo sintomas do ZLCV foram coletadas, posteriormente trituradas em liquidificador com tampão de extração gelado (0.1M Tris-HCL, 0.01M Na_2SO_3 e 0.01M EDTA, ajustado para pH 8,0) na proporção de 1 grama de folha para 8 ml de tampão. As folhas foram trituradas por 30 segundos em velocidade moderada, até ficarem com consistência pastosa.

Em seguida, a amostra triturada foi filtrada em gaze para reter os fragmentos maiores de folhas. O líquido obtido, após a filtração, foi colocado em tubos falcon de 50 ml estéreis previamente resfriados a 4 °C, os tubos foram balanceados e centrifugados (centrífuga eppendorf 5810) a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado em becker de 500 ml previamente resfriado a 4 °C, posteriormente, distribuído em tubos de ultra centrífuga e submetidos a ultracentrifugação (Rotor tipo 25, Beckman) a 25.000 rpm por 30 minutos a 4 °C.

O *pellet* obtido foi ressuscitado em tampão de ressuspensão (0.01M Tris-HCL, 0.01M Na_2SO_3 , 0.01M EDTA, pH ajustado para 7,9, posteriormente adicionou-se 1% de Nonidet P-40 SIGMA) na proporção de 4 ml de tampão por grama de folha. Utilizou-se um bastão de vidro para facilitar a ressuspensão do *pellet* que foi retirado do tubo pelas bordas (região com maior concentração viral) e coletados em becker resfriado. A suspensão foi submetida a homogeneização e em seguida, mantida em agitador magnético, por 30 minutos em câmara fria.

Logo após, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi submetido a colchão de sacarose 30% (o colchão foi

preparado em tampão de ressuspensão em tubos de ultra centrífuga, 30% do volume dos tubos foram preenchidos com o tampão de sacarose e o restante do tubo foi adicionado o sobrenadante coletado). A centrifugação foi a 28.000 rpm (Rotor SW 28, Beckman) por 120 minutos a 4 °C. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 2 ml de tampão 0.01M de citrato ajustado ao pH 6,0 homogeneizado a baixa velocidade em becker de 50 ml em agitador magnético em câmara fria, *overnight*.

A suspensão viral foi submetida a um gradiente (10%, 20%, 30% e 40% de sacarose) preparado em tampão citrato. A suspensão viral foi adicionada em tubo de ultra centrífuga, primeiramente foi preparado o gradiente em dois tubos, e logo em seguida, foi adicionado 1 ml da suspensão viral em cada tubo com o gradiente já estabelecido. Logo após, os tubos foram balanceados e condicionados a rotação de 45.000 rpm (Rotor tipo 45 Ti, Beckman) por 60 minutos. Após a ultracentrifugação, o *pellet* obtido (partículas virais) foi ressuspendido em 1 ml de tampão citrato e armazenado em *freezer* -80 °C.

2.3 - Eletroforese (SDS-PAGE)

A proteína N resultante da purificação foi analisada em gel de poliacrilamida, em eletroforese. O gel de poliacrilamida foi preparado de acordo Sambrook et al., (1989). Foi adicionado, no espaço entre as placas, o gel separador 12% (30% de acrilamida e bis-acrilamida; 1,5M Tris-HCl, pH 8,8; 10% SDS; 10% persulfato de amônio; 10 µl TEMED e o volume final de 10 ml completado com água destilada), após sua polimerização foi adicionado o gel concentrador 5% (30% de acrilamida e bis-acrilamida; 1,0M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 10% persulfato de amônio; 10µl TEMED e o volume final de 4 ml completado com água destilada).

Após a polimerização do gel e retirada do pente, as placas foram fixadas em cuba vertical. Utilizou-se tampão Tris-Glicina 1X (25 mM Tris-HCl; 250 mM glicina pH 8,3; 0,1% SDS). Nos poços do gel foi gotejada solução azul de bromofenol como indicador da frente de corrida e para melhor visualização dos poços. Amostras foram preparadas a partir das suspensões virais obtidas na purificação, em tampão de desnaturação 2X (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM

DTT; 2% SDS; 0,1% BPB; 10% glicerol) na proporção 1:1. As amostras foram fervidas em banho-maria por 5 minutos a 95 °C e posteriormente 10 µl de cada amostra foi aplicado no gel. A ordem de aplicação das amostras do ZLCV no gel foi primeiramente, a ressuspensão obtida após o colchão de sacarose 30%, ressuspensão obtida após o gradiente de sacarose em duplicata e marcador de peso molecular de proteína LMW (Low Molecular Weight, BioRad).

A cuba foi conectada a uma fonte estabilizadora de eletroforese, fixando-se a voltagem de 100 V em amperagem de 50 mA por aproximadamente 40 minutos. O gel foi retirado do aparato e imergido em solução Azul Brilhante de Comassie (0,25 g de Azul Brilhante de Comassie; 125 ml de metanol; 25 ml ácido acético; 100 ml de água Milli-Q), após 30 minutos em agitador magnético sob baixa rotação e passado para solução descorante (70 ml álcool etílico, 15 ml ácido acético e o volume final de 100 ml completado com água destilada) onde ficou descorando, a temperatura ambiente, até a total visualização das bandas.

2.4 - Imunização de Coelhos para Produção de Anti-soro

Dois coelhos foram imunizados com a suspensão viral para a produção de imunoglobulinas G contra a proteína do nucleocapsídeo do ZLCV. A amostra viral foi dividida em 6 alíquotas, sendo três amostras a serem aplicadas por coelho. A primeira alíquota de 125 µl foi emulsificada com 125 µl de adjuvante incompleto de Freund (Adjuvant incomplet Freund, Difco laboratorie U.S.A) e transferida para um seringa de 5 ml e injetada subcutaneamente, em três pontos da região dorsal dos coelhos.

A segunda e terceira aplicações da amostra foram realizadas 15 e 30 dias após a primeira, quando foram injetados 300 µl e 169 µl da amostra, respectivamente, emulsificada em igual volume de adjuvante completo de Freund. Junto com a terceira imunização realizou-se a primeira sangria dos coelhos. A sangria foi feita na região dorsal da orelha após a limpeza com álcool, xileno para aumentar a dilatação das veias e vaselina para facilitar a coleta do sangue. A aplicação de um leve corte da artéria da orelha propiciou a coleta de cerca de 3 ml de sangue do (coelho A) e cerca de 15 ml do (coelho B).

Após a primeira sangria mais três sangrias foram realizadas, para estas, em intervalos de 15 dias da sangria anterior para a posterior. A partir da primeira sangria 15 ml de sangue foi coletado de cada coelho para purificação das proteínas totais.

2.5 - Semi-purificação de Anticorpo

A purificação das proteínas totais foi realizada para as quatro sangrias, imediatamente após as coletas. O sangue em tubo falcon de 15 ml foi incubado em estufa a 37 °C por 1 hora em seguida, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos para precipitação de elementos figurados (hemácias, leucócitos e plaquetas), o plasma obtido foi armazenado em *freezer* -20 °C.

Para a purificação das proteínas totais, 1 ml do soro bruto (plasma) foi diluído em 10 ml de água destilada e em seguida, foi adicionado sulfato de amônio saturado (1M), para precipitação das proteínas totais. Após 1 hora, a solução saturada foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de ½ PBS (NaCl 1,40M; KH₂PO₄ 0,02M Na₂HPO₄. 12H₂O 0,08M; KCL 0,02M pH ajustado para 7.4), e dializado em membrana de diálise *overnight* em 2 L de ½ PBS.

Após dessalinização, a concentração das proteínas da solução foi medida em espectro-fotômetro e ajustada para 1,5 mg de proteína por ml ½ PBS, em um valor de absorvância de A260 nm.

2.5.1 - Adsorção do Anti-soro

Para evitar reações inespecíficas do anticorpo com proteínas da planta foi realizada a adsorção do anti-soro produzido apenas pelo coelho B (para o coelho A não foi necessário). Um mililitro do plasma e igual volume de extrato macerado de folhas de *N. benthamiana* sadias foram misturados e a mistura mantida a temperatura ambiente por 1 hora, seguido por centrifugação a 12.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e acrescido 9 ml de água destilada e mais 5 ml de sulfato de amônio saturado e mantido a temperatura ambiente por 1 hora protegido da luz. Logo após, a mistura foi centrifugada por

30 minutos a 5.000 rpm; o sobrenadante foi coletado sendo acrescido de 5 ml de sulfato de amônio saturado e mantido a temperatura ambiente por 1 hora, sendo centrifugado por 30 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante obtido foi ressuscitado em 1 ml de ½ PBS e dialisado, em membrana, em 2 L de ½ PBS, *overnight*. No dia seguinte, a concentração foi ajustada como descrito no item 2.5.

2.6 - Validação do Anti-soro por Dot-ELISA

O anti-soro produzido foi testado contra extrato de plantas infectadas com ZLCV e também com outros *Tospovirus* como TSWV, GRSV e TCSV, em Dot-ELISA. Plantas de *N. benthamiana* ou *Datura stramonium* mecanicamente inoculadas com cada um dos vírus foram mantidas em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças. Folhas infectadas e sintomáticas foram coletadas para cada vírus e utilizadas no preparo do antígeno, em tampão ½ PBS. Foram preparadas três diluições 1:10, 1:100 e 1:500 em ½ PBS e 5 µl de cada amostra foi depositado em membrana de nitrocelulose (membrana Vs em éster de celulose 0,025 µm de poro e 25 mm de diâmetro - Millipore). Como controle foi utilizado extrato de folhas preparado nas mesmas diluições a partir de plantas de *N. benthamiana* ou *D. stramonium*.

Adicionalmente, os controles positivos e negativos de cada vírus foram depositados em membrana a parte (Figura 10 B) seguindo o mesmo esquema demonstrado acima. As membranas foram secas a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida imersas em tampão de bloqueio (0,4 mg de leite em pó desnatado para 20 ml de ½ PBS) em placa de Petri, sob agitação a 50 rpm por 2 horas. Adicionou-se a placa, o anti-soro produzido contra ZLCV na concentração de 1,5 mg/ml (concentração final na solução de 1 µg/ml) e azida sódica para evitar o crescimento de microrganismos no tampão de bloqueio. A membrana foi mantida sob agitação a 50 rpm, *overnight*.

As membranas passaram por três lavagens de três minutos cada em tampão ½ PBS para retirar o excesso de leite e de IgG. Em seguida, as membranas foram mantidas em conjugado geral com fosfatase alcalina (anti-rabbit IgG Sigma) na proporção de 1 µl de conjugado para 30 ml de ½ PBS e foram deixadas sob agitação a 50 rpm por 2 horas. Seguiram-se três lavagens, como descrito anteriormente e transferidas para tampão de revelação (NaCl 100 mM; Tris-HCl

100 mM; MgCl₂ (6H₂O) 5 mM; pH ajustado para 9,5) acrescido de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl phosphatase (BCIP; SIGMA No. B-8503) e de nitro-blue-tetrazolium (NBT; SIGMA No. N-6876) a concentração final de 0,05 mg/ml e 0,1 mg/ml, respectivamente. Após aproximadamente 5 minutos sob agitação, as amostras positivas nas membranas iniciaram a sensibilização e as membranas foram então transferidas para ½ PBS para a eliminação do excesso de tampão de revelação. As membranas, após secas, foram digitalizadas em *scanner* HP.

3 - Estudos Moleculares

3.1 - Extração de RNA Total

A extração de RNA total foi feita a partir de folhas de *N. benthamiana* sintomáticas. Adotou-se o procedimento descrito por Chomczynski & Sacchi (1987), com modificações. O total de 100 mg de folha foi macerado em nitrogênio líquido, em tubos tipo eppendorf de 1,5 ml de capacidade, com auxílio de pistilo. Logo em seguida, foi adicionado 1 ml de TRIzol® (Invitrogen™) e o tubo mantido em agitador por 1 minuto e depois a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio gelado e a mistura agitada em vórtex por 2 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf) por 15 minutos. Ao sobrenadante (600 µl) coletado em um novo tubo, livre de Rnase, foi adicionado isopropanol (420 µl) para precipitação do RNA e o tubo incubado por 5 minutos em gelo. A mistura foi submetida à centrifugação por 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado em 600 µl de álcool 70% gelado e centrifugado por 5 minutos a 4.000 rpm. O *pellet* foi seco por 30 minutos a temperatura ambiente e então, ressuspenso em 30 µl de água Milli-Q.

Amostras de RNA total de folhas de *N. benthamiana* sadias, também foram extraídas para servir como controle negativo nos ensaios.

3.2 - Extração de RNA Viral

Uma alíquota de 250 µl da ressuspensão obtida na purificação viral, após o colchão de sacarose 30%, foi utilizada para a extração de RNA viral com TRIzol[®] LS Reagent. A alíquota foi adicionado 750 µl de TRIzol[®] LS Reagent. A mistura foi homogeneizada, incubada por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação do nucleocapsídeo e acrescida de 200 µl de clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 segundos e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 12.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante coletado e transferido para um tubo novo livre de Rnase. O RNA total foi precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4° C. O *pellet* obtido foi lavado em 1 ml de álcool 75% e em seguida foi centrifugado a 4.000 rpm por 5 minutos. Após, seco a temperatura ambiente por 30 minutos, o RNA foi ressuspendido em 30 µl de água Milli-Q.

3.3 - Transcrição Reversa (RT) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para as reações da RT-PCR foram adotados vários protocolos visando amplificar a sequência do gene da NSs do segmento S RNA do genoma do ZLCV.

Foram utilizados dois *primers* antisense na obtenção de cDNA, UHP (5' - CACTGGATCCTTTTGT TTTTGT TTTTGT - 3') desenhado para anelar na região intergênica (IGR) denominada “*hairpin*” do segmento S e ZLCV NSs TERM 2 (5'- GGTATAGTTGAAGCTGCTTTTGCT - 3') desenhado segundo sequência do primeiro clone obtido da NSs do ZLCV, no presente trabalho. O anelamento do oligonucleotídeo TERM 2 ocorre na posição 177-153 da sequência da NSs do ZLCV.

O cDNA foi obtido utilizando-se RNA total como molde no caso do oligonucleotídeo UHP e RNA viral para TERM 2. Na reação de transcrição reversa utilizou-se a enzima Super script[™] III First-Strand (Invitrogen[™]), de acordo com as instruções do fabricante. (1µl de primer 10 µM; 1 µl de dNTP 10

3.5 - Preparação de Células Competentes (DH5- α)

O preparo de células competentes foi feito seguindo recomendações de Sambrook et al., (1989). Colônia de *E. coli* cultivada em meio de cultura Luria-Bertani - LB (Sambrook et al., 1989; Peptona 1,0% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1,0% (p/v), Ágar 1,4% (p/v); pH 7,0) foi repicada para tubos falcon de 15 ml contendo 3 ml de meio LB líquido (Peptona 1,0% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1,0% (p/v); pH 7,0) e incubado *overnight* a 37° C em rotação 200 rpm em agitador. Um mililitro desta cultura foi transferido para frasco elermeyer de 400 ml contendo 100 ml de *Super Optimal Broth* (SOB: Triptona, 20 g; extrato de levedura, 5 g; NaCl, 0,584g; 250 mM KCl; pH 7,0; 2 M MgCl₂) pré aquecido e o frasco incubado a 37° C, até atingir a densidade optica (OD₆₀₀) entre 0,4 e 0,6. A cultura foi então transferida para tubos que foram mantidos no gelo por 30 minutos e, em seguida, centrifugados a 4.000 rpm por 17 minutos a 4° C. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 400 ml de água destilada autoclavada. Seguiu-se nova centrifugação a 4.000 rpm por 22 minutos a 4° C e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 200 ml de glicerol 10% resfriado. Após centrifugação a 4.000 rpm por 22 minutos a 4° C, o *pellet* foi ressuscitado em 10 ml de glicerol 10% resfriado. Última centrifugação de 4.000 rpm por 22 minutos foi processada e o *pellet* obtido foi ressuscitado em 1 ml de glicerol 10% resfriado. Aliquotas de 40 μ l foram transferidas para eppendorfs de 1,5 ml e estocados em *freezer* -80 °C.

3.6 - Clonagem do Gene NSs e Seleção de Recombinantes

Os produtos amplificados via RT-PCR foram eluídos do gel de agarose utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e utilizados na reação de ligação em plasmídeo vetor a ser transformado em *Escherichia coli* DH5- α .

O produto de RT-PCR foi ligado ao vetor pGEM-T easy (Promega), segundo recomendações do fabricante. A reação de ligação (tampão, 2,5 μ l; DNA, 1,5 μ l; vetor pGEM-T easy, 0,5 μ l (50 ng); T4 DNA Ligase, 0,5 μ l), foi realizada a temperatura ambiente por 1 hora. Logo em seguida, a ligação foi dialisada em

membrana de diálise (Millipore membrane filters 0,025 µm VWSP nitrocellulose) por 15 minutos a temperatura ambiente.

A transformação em *E. coli* foi feita em eletroporador (Gene Pulser II -Bio Rad). Adicionou-se 2 µl da reação de ligação a 40 µl de células DH5-α eletro-competentes, em tubo de plástico tipo eppendorf de 1,5 ml. Após breve mistura, a reação foi transferida para cuveta específica (Gene Pulser Curvette - BioRad). A cuveta foi acoplada ao eletroporador e submetida às seguintes condições: capacitância de 25 µF; resistência mínima de 200 Ω e máxima de 700 Ω; voltagem de 1,80 KV. Em seguida, adicionou-se 1 ml de meio LB líquido ao tubo que foi incubado a 37° C, com agitação de 100 rpm por 1 hora.

A suspensão bacteriana (100 µl/placa) foi depositada em placas de petri contendo meio de cultura Luria-Bertani-ágar acrescido de ampicilina (50 µg/ml), X-Gal (20 mg/ml) e IPTG (0,1 M). Estes últimos foram acrescentados e espalhados com auxílio de alça Drigalski, após a secagem do meio. As placas foram vedadas com parafilme e mantidas em estufa a 37° C, *overnight*.

Para a seleção dos recombinantes, cinco colônias brancas foram coletadas individualmente de cada transformação, com auxílio de palitos estéreis e repicadas para tubos contendo 5 ml de meio LB acrescido de ampicilina (diluição de 1:1000). Colônias azuis também foram selecionadas como controle. Os tubos foram mantidos sob agitação de 250 rpm *overnight* a 37° C. Os procedimentos seguiram as recomendações dos respectivos fabricantes e indicações contidas em Sambrook et al. (1989).

A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™) de acordo com as indicações do fabricante. Observado a presença do plasmídeo bacteriano em gel de agarose 1,0%, após a miniprep, o DNA plasmidial foi submetido à digestão enzimática com a enzima EcoRI (Invitrogen™). Observado em gel de agarose a presença dos insertos com seus tamanhos correspondentes, o DNA plasmidial foi aliquotado, 12 µl em eppendorf de 1,5 ml e estocados no *freezer* -20 °C para posterior sequenciamento.

3.7 - Sequenciamento

Os clones (ZLCV NSs 2000 pb e ZLCV NSs 250 pb) foram enviados para sequenciamento. O sequenciamento foi realizado nos dois sentidos de leitura, senso e antisenso, utilizando-se os *primers* do vetor pGEM T Easy, T7 e SP6. O sequenciamento foi feito pela técnica de reação de terminação em cadeia (Sanger et al., 1977), pela empresa Macrogen na Coréia do Sul.

3.8 - Análise das Sequências

Na análise das sequências utilizou-se o programa Vector NTI 11 (Invitrogen™). Os cromatogramas das sequências foram analisados no software Trev version 1.9 (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/pubseq/>) e a comparação das sequências obtidas para NSs com as demais sequências depositadas no GenBank foi feita por meio do Nucleotide Blast do site do National Center for Biotechnology Information NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990).

Análise de identidade entre as sequências de aminoácidos da NSs das espécies de gênero *Tospovirus* foi realizada com auxílio da ferramenta DNAMAN version 7 Lynnon Corporation (2009).

O alinhamento das sequências da NSs foi feita com o programa ClustalW do site da European Molecular Biology Laboratory (EMBL) - European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), (Chena et al., 2003). Múltiplos alinhamentos de sequências de aminoácidos gerados pelo ClustalW foram usados para a análise filogenética com o software MEGA Version 4.0.2 (Tamura et al., 2007). A árvore filogenética foi construída usando máxima parcimônia, método modelo com 'Branch & Bound', padrão de parâmetros de 1.000 repetições em análises de *bootstrap*.

Box-Shade foi a ferramenta utilizado para visualização dos alinhamentos (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

A análise de domínios da sequência foi desenvolvida usando o Prosite (<http://expasy.ch/prosite>), (Gattiker et al., 2002).

RESULTADOS

1 - Estudos Biológicos

1.1 - Confirmação da Ausência de Infecção Mista

Após a inoculação mecânica do ZLCV em plantas de *N. Benthamiana*, a partir de folhas sintomáticas com ZLCV, foi feito DAS-ELISA para certificação da ausência de infecção mista na amostra proveniente do campo.

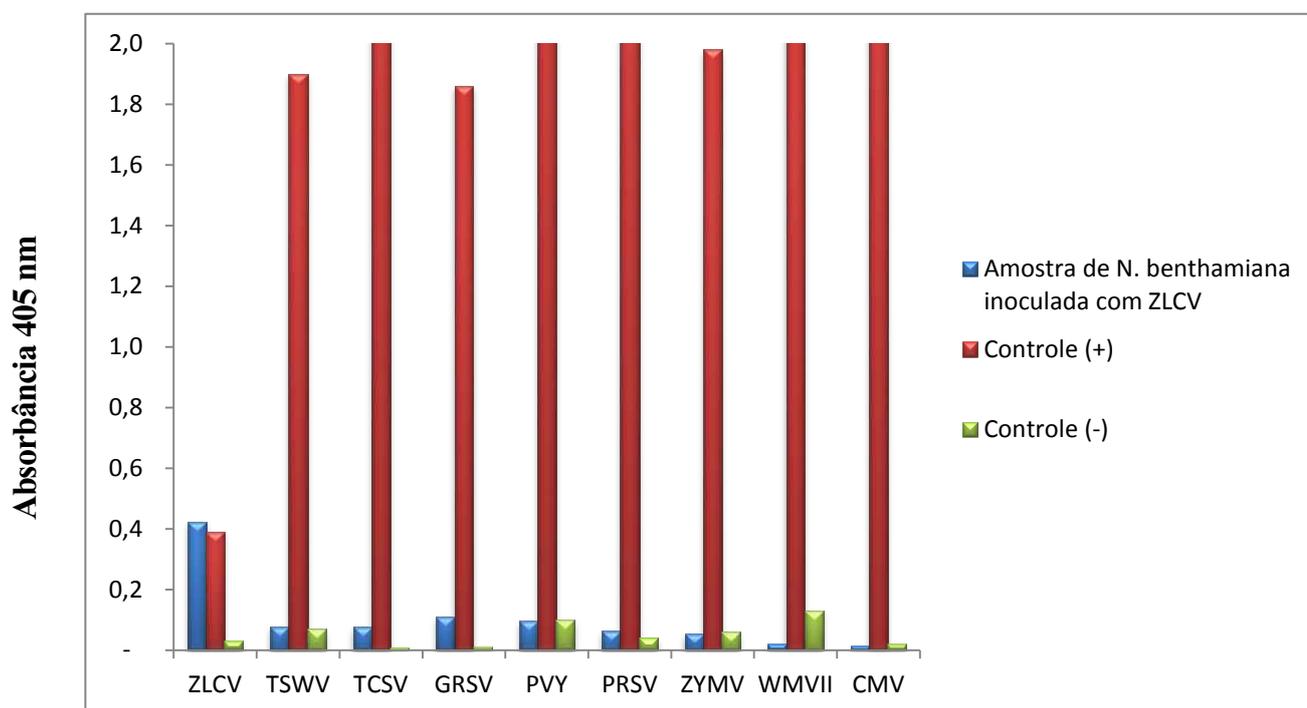


Gráfico 1 – Resultado do teste DAS-ELISA usando anti-soro policlonal contra os vírus ZLCV, TSWV, TCSV, GRSV, PVY, PRSV, ZYMV, WMVII e CMV. Extrato foliar proveniente de *N. benthamiana* inoculada com ZLCV na diluição de 10^{-5} . Colunas em azul representam amostra de extrato foliar de *N. benthamiana* inoculada com ZLCV. Colunas em vermelho representam extrato foliar de diferentes hospedeiras (*N. benthamiana*, *D. stramonium*, “TNN”, *N. rustica*, “Sansum”, *C. pepo*) inoculadas com ZLCV, TSWV, TCSV, GRSV, PVY, PRSV, ZYMV, WMVII e CMV na diluição de 10^{-5} (controles positivos). Colunas em verde representam extrato foliar de plantas não inoculadas (controles negativos). Eixo X = valor de absorbância 405nm. Eixo Y = amostras virais e seus respectivos anti-soros utilizados para avaliar a presença ou ausência dos vírus na amostra de planta inoculada com ZLCV.

Observa-se pelos resultados obtidos nos testes sorológicos, a ausência de TSWV, TCSV, GRSV, *Potato virus Y* (PVY), *Papaya ringspot virus* - type watermelon (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV II) e *Cucumber mosaic virus* (CMV), nas plantas de *N. benthamiana* inoculadas com ZLCV visando a multiplicação do inóculo do vírus

(Gráfico 1). Para esses vírus, os valores de absorvância dos controles negativos em relação aos valores de absorvância das amostras testadas são inferiores, ou seja, estão pelo menos duas vezes menores. No teste utilizado, a amostra pode ser considerada positiva, se o valor da absorvância da amostra analisada for pelo menos duas vezes maior em relação ao valor de absorvância do controle negativo ou ainda ter a mesma proporção do controle positivo. Estes resultados indicam que nas plantas inoculadas com ZLCV, não foram detectados TSWV, TCSV, GRSV, PVY, PRSV, ZYMV, WMV II e nem CMV, assegurando assim a pureza do isolado. Para o ZLCV observa-se pelo Gráfico 1 que os valores de absorvância obtidos para a amostra ($>0,4$) e aquele obtido para o controle positivo (2,0) foram muito superiores ao valor obtido para o controle negativo.

1.2 - Círculo de Hospedeiras

A confirmação da presença de apenas ZLCV nas plantas de *N. benthamiana* inoculadas indicaram que estas poderiam ser utilizadas como fonte de inóculo para o experimento. No estudo do círculo de plantas hospedeiras foram testadas espécies das seguintes famílias botânicas: *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Convolvulaceae*. A presença de sintomas sistêmicos foi observada inicialmente após 15 dias da segunda inoculação em apenas 12 hospedeiras diferentes do total de plantas testadas. Apenas uma hospedeira apresentou sintomas locais (Tabela 2), os sintomas locais (reação de hipersensibilidade) foram observados inicialmente no primeiro dia após a primeira inoculação. Os sintomas foram avaliados semanalmente até o final do ciclo de vida das plantas.

As hospedeiras sintomáticas (Anexo, Figura 17) exibiram uma diversidade de sintomas como de hipersensibilidade, lesão clorótica, mosaico, clorose, deformação foliar, morte da planta, redução de crescimento, clareamento de nervuras, embolhamento foliar, encarquilhamento foliar e necrose foliar. Os sintomas apresentados e suas respectivas hospedeiras estão demonstrados na tabela 2.

As plantas que não apresentaram sintomas foram submetidas ao teste Dot-ELISA para a confirmação da ausência do vírus ou sua presença. Não foi

observado a presença do vírus em nenhuma planta assintomática (dados não apresentados).

Das plantas sintomáticas foram fotografadas as folhas e avaliados os tipos de sintomas expressados por ZLCV nessas hospedeiras (Anexo, Figura 17). Fez-se PCR com *primers* específicos para a detecção do ZLCV nas plantas sintomáticas (Giampan et al., 2009) e o produto da reação foi avaliado em gel de agarose 0,8%, a presença do vírus foi confirmada pela amplificação da sequência da proteína N com o aparecimento de bandas de aproximadamente 350 pb (Figura 7).

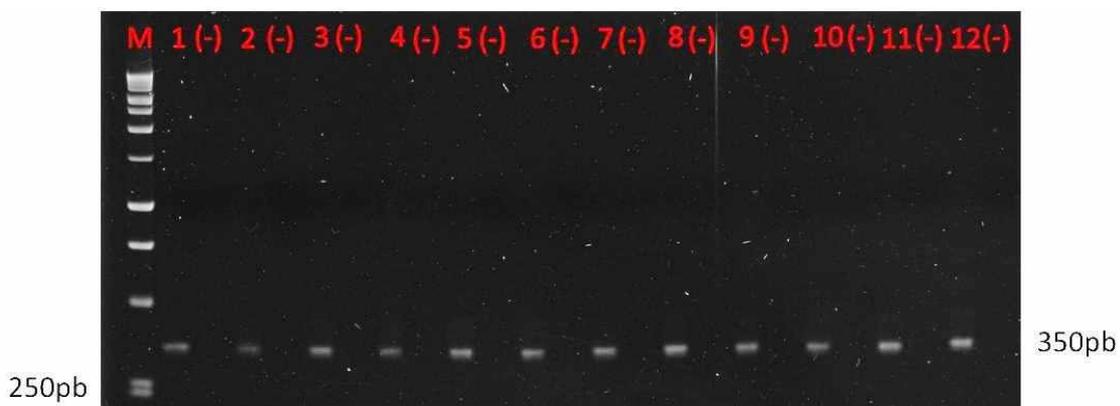


Figura 7 – Amplificação de região da sequência do SRNA (N) visualizada em gel de agarose 1,0%. Confirmação da presença do ZLCV nas plantas sintomáticas avaliadas no círculo de hospedeiras. **1:** Pepino verde comprido, **2:** Pepino safira, **3:** Pepino caipira esmeralda, **4:** Melancia “Crimson Sweet”, **5:** *Cucurbita pepo* cv. “Caserta”, **6:** *Datura stramonium*, **7:** *Nicotiana tabacum* “TNN”, **8:** *Nicotiana tabacum* “Sansum”, **9:** *Nicotiana benthamiana*, **10:** Pimenta Doce Comprida, **11:** *Capsicum chinenses* PI 159236, **12:** *Gomphrena globosa*. (-) = controle negativo. **M:** marcador 1kb DNA ladder (Promega).

Tabela 2 - Círculo de plantas hospedeiras do ZLCV determinado via inoculação mecânica em diversas espécies de plantas. Os sintomas sistêmicos foram inicialmente avaliados após 15 dias da segunda inoculação.

| Hospedeiras | Sintomas | |
|--|----------|----------------|
| | Local | Sistêmico |
| Cucurbitaceae | | |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Casca Grossa" | ... | ... |
| <i>Citrullus lanatus</i> Cv. "Rajada" | ... | ... |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Caipira" | ... | ... |
| <i>Citrullus lanatus</i> Cv. "Congo" | ... | ... |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. Híbrida | ... | ... |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Verde Comprido" | ... | M, EF, NF, MP |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Sugar Baby" | ... | ... |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Manina Creme" | ... | ... |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Bahiana Tropical" | ... | ... |
| <i>Cucumis anguria</i> Cv. do Norte | ... | ... |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Menina Brasileira" | ... | ... |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Tronco Verde Redonda" | ... | ... |
| <i>Cucumis melo</i> Cv. "Imperial 45" | ... | ... |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Safira" | ... | M, NF, MP |
| <i>Cucumis melo</i> Cv. "Eldorado" | ... | M, DF, NF, MP |
| <i>Citrullus lanatus</i> Cv. "Charleston Gray" | ... | ... |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Goianinha" | ... | ... |
| <i>Cucurbita</i> spp. Cv. "Nova caravela" | ... | ... |
| <i>Cucumis sativus</i> Cv. "Caipira Esmeralda" | ... | M, EF, NF, MP |
| <i>Citrullus lanatus</i> Cv. "Crimson Sweet" | ... | C, DF, NF, MP |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Menina Brasileira peçoce" | ... | ... |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Moranga exposição" | ... | ... |
| <i>C. pepo</i> Cv. "Caserta" | ... | M, MP, EF |
| Solanaceae | | |
| <i>Datura stramonium</i> | ... | LC, CN. |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | ... | ... |
| <i>Nicotiana tabacum</i> "TNN" | ... | DF, EB, RC, LC |
| <i>Nicotiana tabacum</i> "Turkish" | ... | ... |
| <i>Nicotiana tabacum</i> "Sansum" | ... | EB, LN, DF |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | ... | RC, EF, NF, MP |
| <i>Nicotiana glutinosa</i> | ... | ... |
| <i>Nicotiana rustica</i> | RH | ... |
| <i>Nicandra physaloides</i> | ... | ... |
| <i>Physalis occidentalis</i> | ... | ... |
| <i>Capsicum chinense</i> PI 159236 | ... | EB, EF |
| <i>Capsicum annum</i> | ... | ... |
| <i>Capsicum annum</i> Cv. "Vermelho Gigante" | ... | ... |
| <i>Solanum lycopersicum</i> Cv. "Coração de Boi" | ... | ... |
| <i>C. annum</i> Cv. "Doce Comprida" | ... | DF, C |
| <i>C. annum</i> Cv. "Italiano Amarelo Gigante" | ... | ... |
| <i>C. annum</i> Cv. "Cambuá Chapéu de Bispo " | ... | ... |
| <i>Solanum gilo</i> Cv. "Redondo Morro Grande" | ... | ... |
| Fabaceae | | |
| <i>Phaseolus</i> sp. | ... | ... |
| <i>Phaseolus</i> BT2 | ... | ... |
| <i>Phaseolus</i> Adzuk | ... | ... |
| <i>Pisum sativum</i> "Grão Luciana" | ... | ... |
| <i>Vigna faber</i> | ... | ... |
| Chenopodiaceae | | |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> | ... | ... |
| <i>Chenopodium quinoa</i> | ... | ... |
| <i>Beta vulgaris</i> | ... | ... |
| Amaranthaceae | | |
| <i>Gomphrena globosa</i> | ... | RC, LC, DF |
| Convolvulaceae | | |
| <i>Ipomoea setosa</i> | ... | ... |

Sintomas avaliados: Reação de hipersensibilidade (RH), lesão clorótica (LC), lesão necrótica (LN), mosaico (M), clorose (C), deformação foliar (DF), morte da planta (MP), redução do crescimento (RC), clareamento de nervuras (CN), embolhamento (EB), encarquilhamento foliar (EF), necrose foliar (NF) e sem sintomas (...).

2 - Estudos Sorológicos

A qualidade da purificação do ZLCV, feita de acordo com De Ávila et al., (1990), foi avaliada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), aplicando-se a amostra viral obtida após o gradiente de sacarose (Figura 8 (1)) e amostra coletada após colchão de sacarose (Figura 8 (2)). O peso molecular da proteína do nucleocapsídeo dos *Tospovirus* é de aproximadamente 29 kD, o mesmo peso molecular observado nas amostras virais no gel (Figura 8)

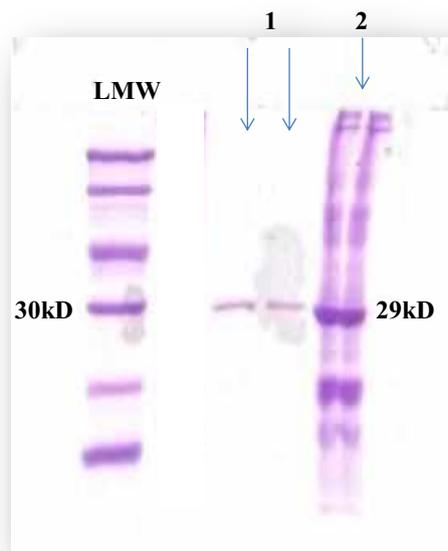


Figura 8 - Análise do peso molecular da proteína do nucleocapsídeo do ZLCV a partir de extratos purificados via análise em gel de poliacrilamida. LMW (marcador de peso molecular (BioRad)), 1 - aplicação em duplicata da suspensão viral após o gradiente de sacarose, 2- amostra viral após o colchão de sacarose, 30kD e 29kD peso molecular de banda do marcador e nucleocapsídeo do ZLCV, respectivamente.

Dois coelhos foram imunizados com os extratos purificados e analisados conforme descrito no material e métodos. As sangrias foram realizadas, e a concentração de imunoglobulinas totais foi determinada em espectrofotômetro. Posteriormente, foi realizado o ensaio de Dot-ELISA para a validação do anti-soro produzido. Na purificação das imunoglobulinas, tanto para o anti-soro do coelho A, quanto para o coelho B, foi feita a adsorção. No entanto, para o coelho A, verificou-se posteriormente, não haver a necessidade de tal procedimento, pois, para este anti-soro, não foi observado reação com extrato de planta sadia, entretanto a adsorção foi feita apenas para comparação. Em contraste, para o coelho B, observou-se no anti-soro obtido uma sensibilização com o controle

negativo, demonstrando, dessa forma, reação deste segundo anti-soro com proteínas da planta. Após a adsorção dos anti-soros novamente foi realizado o teste de Dot-ELISA com os mesmos. Como esperado, houve uma leve diminuição da reação do anticorpo com o antígeno, e a reação inespecífica foi totalmente eliminada como pode se visualizado na Figura 9:

| | (+) | (-) | |
|--|---|---|-----------------------------|
| | 1:10 | 1:10 | |
| |  |  | Coelho A S/ Adsorção |
| |  |  | Coelho A C/ Adsorção |
| |  |  | Coelho B S/ Adsorção |
| |  |  | Coelho B C/ Adsorção |

Figura 9 - Dot-ELISA para validação do anti-soro contra ZLCV. S/= sem e C/ com. (+) = controle positivo, amostra foliar macerada inoculada com ZLCV e (-) = controle negativo, amostra foliar macerada sem a presença de vírus. 1:10 = concentração do extrato foliar macerado (1 µl do extrato macerado em 10µl de ½ PBS).

Um ensaio para avaliar a especificidade do anti-soro do ZLCV em relação aos demais *Tospovirus* também foi feito. As espécies utilizadas para avaliação foram: TSWV, GRSV e TCSV e o anti-soro utilizado foi o produzido pelo coelho A, pois demonstrou-se um anti-soro melhor em comparação ao anti-soro produzido pelo coelho B, não tendo a necessidade de se fazer adsorção e por sensibilizar de forma mais evidente a membrana (Dados não apresentados). Como demonstrado na figura abaixo, o anti-soro construído para ZLCV, apresentou reação cruzada com os vírus TCSV e GRSV. Observa-se reação cruzada até a diluição de 1:100, na diluição de 1:500 a reação não foi observada, no entanto, o anti-soro do ZLCV, nas três diluições, reagiu sensibilizando o ponto no qual foi aplicado a amostra viral. Demonstrando que na diluição de 1:500 foi possível diferenciar por Dot-ELISA, ZLCV das outras espécies de *Tospovirus* avaliadas no presente estudo.

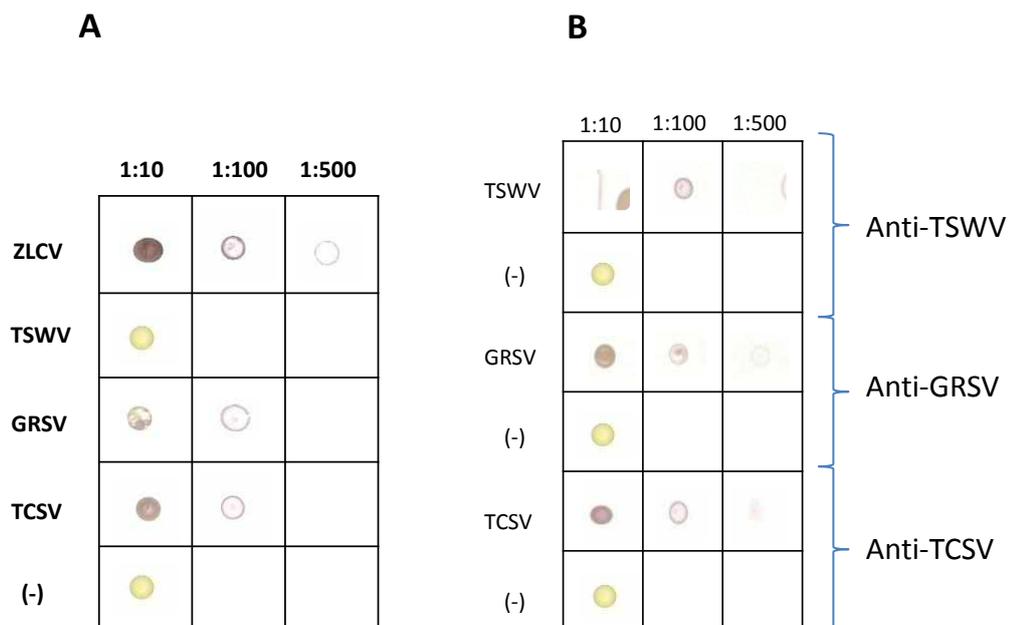


Figura 10: **A-** Ensaio Dot-ELISA para avaliar especificidade do anti-soro do ZLCV com os *Tospovirus* TSWV, GRSV e TCSV. **B-** Dot-ELISA com os anti-soros do TSWV, GRSV e TCSV para avaliar a presença dos respectivos vírus nas amostras de plantas utilizadas para o ensaio. (-) = controle negativo (plantas com ausência de vírus).

3 - Estudos Moleculares

Para obtenção do gene da proteína NSs do ZLCV, a partir de folhas de *N. benthamiana* sintomáticas foi extraído o RNA total. A transcrição reversa foi processada com os *primer* UHP e posteriormente, a PCR foi realizada com a combinação dos *primers* ZLCV NSs D e UHP. O produto amplificado foi de aproximadamente 2000 pb (Figura 11)

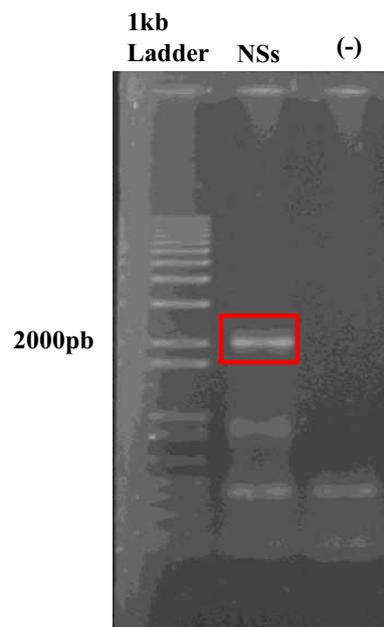


Figura 11: Amplificação do gene da proteína NSs do ZLCV visualizado em gel de agarose 0,8%. = NSs do ZLCV, (-) = Controle negativo, RNA total de folhas de *N. benthamiana* ausente de vírus. Marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™)

O produto de aproximadamente 2000 bp obtido foi clonado em vetor pGEM-T easy (Promega), posteriormente, confirmada a presença do inserto, este foi sequenciado. Com a sequência obtida, foi analisada a sua identidade no banco de dados do NCBI, através do BLAST e confirmado como sendo parte da ORF da proteína NSs do ZLCV pela identidade obtida de 73.2% com a NSs do TSWV.

Como a região N-terminal da NSs do ZLCV não foi amplificada com a combinação anteriormente utilizada de *primers* (ZLCV NSs D e UHP), uma nova PCR com os *primers* (ZLCV NSs TERM 2 e J13) foi realizada, na qual se obteve um produto amplificado de aproximadamente 250 pb (Figura 12)

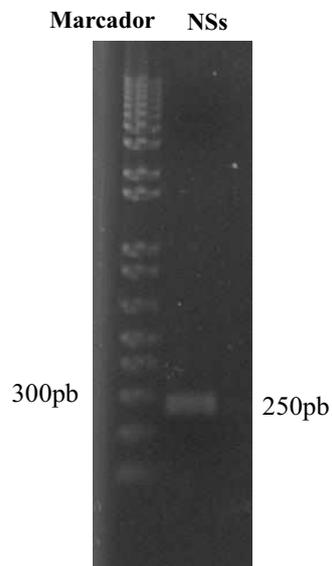


Figura 12- Amplificação por PCR da porção N terminal do gene NSs analisada em gel de agarose 0,8%. Marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™).

Este foi clonado em vetor pGEM-T easy (Promega) e posteriormente sequenciado. A sequência obtida foi adicionada a porção anterior determinada da ORF, o qual resultou na sequência completa do gene da proteína NSs do ZLCV. (sequência de nucleotídeos da NSs do ZLCV em Anexo, Figura 16 A).

A sequência total obtida apresentou tamanho de 2177 pb. A análise da ORF no programa Vector NTI 11 (Invitrogen™) demonstrou que a proteína NSs do ZLCV possui um tamanho de 1404 pb, tendo ATG (na posição 97 pb) como códon de iniciação e TAG (na posição 1500 pb) como códon de terminação

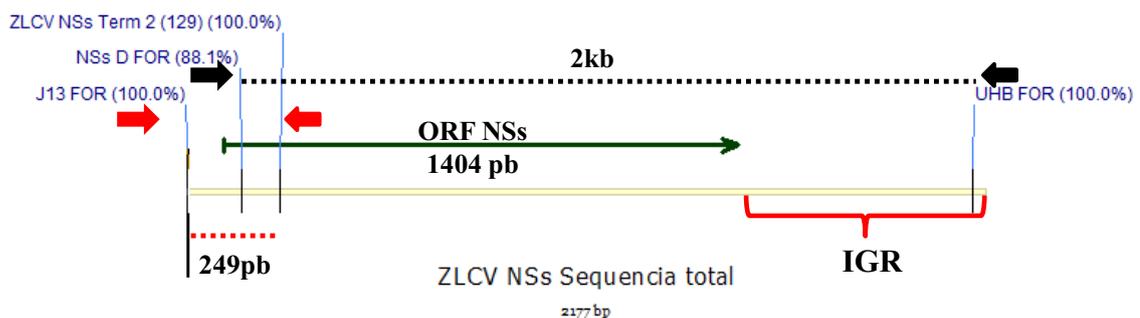


Figura 13 - Representação esquemática de amplificação do gene da NSs do ZLCV contendo além da ORF parte da região intergênica (IGR) em vermelho. Barra em marrom claro representa todo o segmento S de 2.9 kb. Barra escura com formato de flecha representa a ORF da NSs, as setas pretas representam a combinação dos *primers* ZLCV NSs D e UHP utilizados para amplificação da sequência representada pelo pontilhado preto. As setas vermelhas representam a combinação de *primers* J13 e ZLCV NSs TERM 2 para a amplificação do N terminal da sequência que contém o start códon, sequência representada pelo pontilhado vermelho. Números em parênteses representam a percentual de anelamento dos primers na sequência.

3.1 - Análise de Identidade da Proteína NSs do ZLCV Dentro do Gênero *Tospovirus*

Empregando-se o programa Vector NTI 11 (Invitrogen™) foi obtida a sequência traduzida da ORF NSs do ZLCV (Anexo, Figura 16 B), que apresenta peso molecular de aproximadamente 53kD, tamanho de 468 aminoácidos. Foi avaliada a identidade da NSs com as principais espécies do gênero *Tospovirus*, utilizando-se da ferramenta Protein Blast, obteve-se o valor de identidade de aminoácidos entre as proteínas NSs das principais espécies do gênero *Tospovirus* (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise comparativa das identidades^a (%) de aminoácidos da proteína NSs (supressora de silenciamento gênico) entre espécies do gênero *Tospovirus*.

| Espécies | ZLCV | CSNV | TSWV | GRSV | TCSV | INSV | IYSV | WBNV | WSMV | GTV | CaCV | MYSV | GBNV |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| ZLCV | 100% | | | | | | | | | | | | |
| CSNV | 69.0% | 100% | | | | | | | | | | | |
| TSWV | 73.2% | 81.6% | 100% | | | | | | | | | | |
| GRSV | 69.6% | 74.7% | 81.8% | 100% | | | | | | | | | |
| TCSV | 72.3% | 75.2% | 82.5% | 88.4% | 100% | | | | | | | | |
| INSV | 54.1% | 55.6% | 56.8% | 55.7% | 52.8% | 100% | | | | | | | |
| IYSV | 21.2% | 21.0% | 20.5% | 22.3% | 21.9% | 20.9% | 100% | | | | | | |
| WBNV | 17.3% | 18.5% | 18.5% | 18.2% | 19.2% | 19.2% | 46.0% | 100% | | | | | |
| WSMV | 18.7% | 20.8% | 20.6% | 19.6% | 21.0% | 21.0% | 48.7% | 77.7% | 100% | | | | |
| GTV | 20.1% | 20.4% | 21.0% | 20.3% | 21.0% | 20.6% | 50.8% | 73.1% | 78.4% | 100% | | | |
| CaCV | 18.7% | 20.4% | 20.3% | 19.4% | 21.0% | 20.6% | 50.8% | 74.7% | 80.4% | 89.1% | 100% | | |
| MYSV | 18.3% | 19.9% | 19.4% | 18.1% | 19.8% | 19.5% | 40.7% | 43.5% | 49.7% | 47.2% | 47.6% | 100% | |
| GBNV | 18.9% | 21.3% | 20.6% | 20.6% | 22.0% | 20.3% | 49.0% | 78.6% | 84.5% | 81.1% | 82.2% | 49.2% | 100% |

GRSV (*Groundnut ring spot virus*); TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*); CSNV (*Chrysanthemum stem necrosis virus*); TSWV (*Tomato spotted wilt virus*); ZLCV (*Zucchini lethal chlorosis virus*); INSV (*Impatiens necrotic spot virus*); WBNV (*Watermelon bud necrosis virus*); GBNV (*Groundnut bud necrosis virus*); WSMV (*Watermelon silver mottle virus*); IYSV (*Brazilian isolate of Iris yellow spot virus*); CaCV (*Gloxinia Tospovirus*); GTV (*Watermelon silver mottle virus*); MYSV (*Melon yellow spot virus*).

^a Porcentagem de identidade entre sequências de aminoácidos de proteínas NSs foram obtidas utilizando o software DNAMAM version 7 Lynnon Corporation, 2009.

As maiores identidades observadas entre as proteínas NSs foi de 88.4% entre GRSV e TCSV e entre GTV e CaCV de 89.1%. A maior identidade observada da NSs do ZLCV foi com TSWV de 73.2%. A menor identidade foi de 18.1% entre GRSV e MYSV e entre ZLCV e WBNV com uma porcentagem de identidade de 17,3%. No grupo Americano (CSNV, TCSV, GRSV, TSWV, ZLCV e INSV), observa-se que a menor identidade é obtida na comparação entre

TCSV e INSV de 52.8%. Quando a NSs do ZLCV é comparada, a menor identidade observada foi de 54.1% também com INSV. ZLCV é um vírus que possui restrição em nível de infecção de hospedeiras, a sua maior identidade foi de 73.2% com TSWV é observada uma diferença de aminoácidos de 26.8%. Em um comparativo, TSWV que é um vírus que apresenta uma gama de hospedeiras ampla, a sua maior identidade foi com TCSV de 82.5% apresentando uma diferença de 17.5%. É nitidamente observada uma diferença significativa de aminoácidos de uma proteína que provavelmente apresenta relação com sua patogenicidade entre um vírus que apresenta baixa amplitude em infecção de hospedeiras (ZLCV) e um vírus que apresenta uma amplitude grande na infecção de hospedeiras (TSWV).

3.2 - Análise Filogenética com Base na Proteína NSs

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NSs foi feito com auxílio do programa ClustaW2 (Chenna et al., 2003) e o múltiplo alinhamento das sequências gerado foi usado para a construção da árvore filogenética com o auxílio do software MEGA Version 4.0.2 (Tamura et al., 2007).

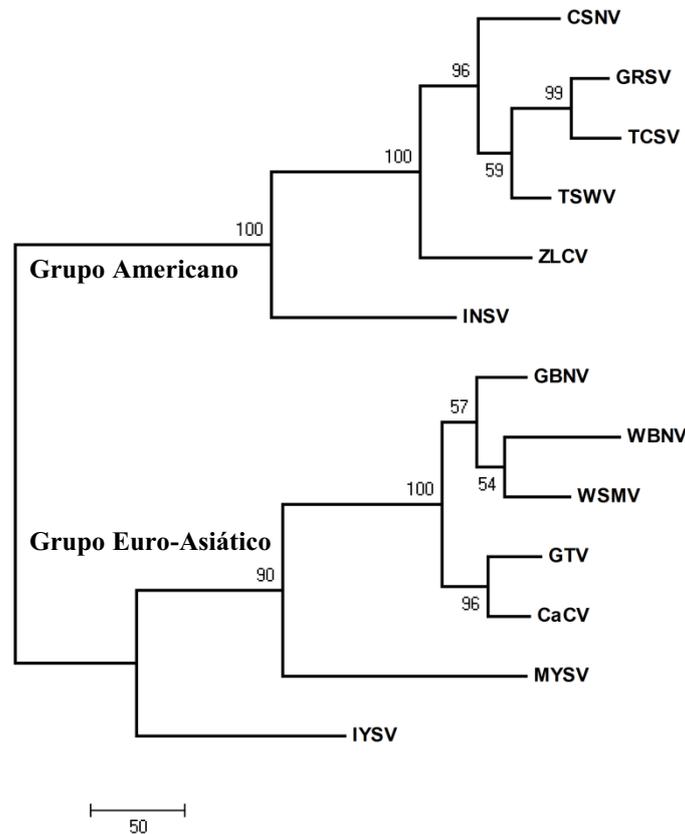


Figura 14- Árvore filogenética de espécies de *Tospovirus* baseado na proteína NSs. Os números próximos das linhas indicam a frequência dos grupos após análise de bootstrap (1.000 repetições). A árvore filogenética foi construída usando o método de parcimônia máxima com modelo 'branch & bound' com parâmetros padrão de 1.000 repetições em análise bootstrap.

GRSV, *Groundnut ring spot virus* (Sequência não depositada); TCSV, *Tomato chlorotic spot virus* (Sequência não depositada); CSNV, *Chrysanthemum stem necrosis virus* (Genbank: AB600873. 1); TSWV, *Tomato spotted wilt virus* (Genbank: DQ915948. 1); ZLCV, *Zucchini lethal chlorosis virus* (Sequência não depositada); INSV, *Impatiens necrotic spot virus* (Genbank: FN400772. 1); WBNV, *Watermelon bud necrosis virus* (Genbank: ADB19865. 1); GBNV, *Groundnut bud necrosis virus* (Genbank: NP619700. 1); WSMV, *Watermelon silver mottle virus* (Genbank: NP620770. 1); IYSV, Brazilian isolate of *Iris yellow spot virus* (Genbank AF001387. 1); CaCV, *Gloxinia Tospovirus* (Genbank: ABC86906. 1); GTV, *Watermelon silver mottle virus* (Genbank: AAC15500. 1); MYSV, *Melon yellow spot virus* (Genbank: BAG82845. 1).

Observa-se que dentro do grupo Americano, INSV é o mais distante dos demais vírus. O ponto de divergência que origina o ramo de INSV é distinto

dos demais. Quando observado o grupo formado por CSNV, GRSV, TCSV, TSWV e ZLCV, este é o mais distante, sendo a ponto de divergência que origina o ramo do ZLCV distinto daquele que origina a ramificação dos demais vírus, ou seja, os ancestrais parecem estar mais distantes. Com base na análise de identidade de aminoácidos é observada a maior proximidade do ZLCV com TSWV.

A filogenia derivada do alinhamento múltiplo das proteínas NSs dos vírus do grupo Euro-Asiático demonstrou ser semelhante com a observada para grupo Americano. Como no grupo Americano, dois vírus demonstram ser mais distantes, no caso, IYSV e MYSV, sendo que entre os dois, MYSV é mais distante das demais espécies. INSV e IYSV são os extremos, ou seja, as espécies mais distintas dos dois grupos gerados. A mesma semelhança é observada entre ZLCV e MYSV, depois de INSV e IYSV são os vírus mais distantes dos demais vírus dos seus respectivos grupos. A mesma relação de proximidade entre GRSV e TCSV é observada entre CaCV e GTV.

3.3 - Diversidade de Sequência da Proteína Supressora de Silenciamento Gênico (NSs) dos *Tospovirus*.

Múltiplo alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína NSs revelou a presença de várias regiões conservadas (Anexo, Figura 15) observadas tanto na porção N-terminal como na região central da ORF e na porção C-terminal da sequência de aminoácidos. É Claramente observado, em alguns pontos das sequências das proteínas NSs analisadas, a diferenciação no grau de conservação de aminoácidos entre o grupo Americano e Euro-Asiático (Figura 15, regiões marcadas em escuro e/ou cinza em partes da sequência. Parte em cinza demonstra uma parcial conservação de aminoácidos entre as espécies, parte em preto representa uma total conservação entre as espécies).

Com auxílio da ferramenta ExPASy Prosite (Gattiker et al., 2002) puderam ser observados alguns domínios na sequência. Os mais conservados são: **1- N-myristoylation**, **2- Casein kinase II phosphorylation**, **3- Tyrosine kinase phosphorylation**, 4-Protein kinase C phosphorylation, 5- ATP/GTP-binding site motif A (P-loop), 6- N-glycosylation. Os três primeiros são os mais conservados em relação aos grupos, estando presentes, tanto nas espécies virais do grupo

Americano e Euro-Asiático, como nas proteínas NSs em espécies de outros dois gêneros da família *Bunyaviridae*: *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus* (dados não apresentados). A região do alinhamento que apresenta maior convergência de aminoácidos, entre os dois grupos, encontra-se entre os aminoácidos 396 a 410 (região sublinhada em vermelho), região esta, que está localizada na extremidade C-terminal das sequências de aminoácidos alinhadas (Anexo, Figura 15).

DISCUSSÃO

Como observado nos demais trabalhos de círculo de hospedeiras que foram realizados para ZLCV, ficou evidente a restrição de infecção do vírus às famílias botânicas de cucurbitáceas e solanáceas. Com o intuito de avaliar a diversidade de isolados e/ou estabilidade biológica da espécie viral em relação às hospedeiras, no presente trabalho, foi feito um novo espectro de hospedeiras incluindo um número significativamente maior de hospedeiras de cucurbitáceas e solanáceas. Como demonstrado na Tabela 2, ZLCV manteve seu círculo de infecção restrito a poucas espécies hospedeiras, sugerindo dessa forma, a estabilidade genética do vírus. Todavia, ensaios avaliando a variabilidade da sequência do RNA S do vírus devem ser realizados para a confirmação da estabilidade genética do vírus. ZLCV causou infecção sistêmica em *Nicotiana tabacum* “sansom”, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* “TNN” e *Gomphrena globosa* que até o momento, estavam relatadas como hospedeiras de infecção local (Rezende et al., 1995, 1997; Bezerra et al., 1999). Também foi observada a infecção de duas novas cultivares de pepino: Pepino Verde Comprido e pepino Caipira Esmeralda e uma cultivar nova de pimenta: Pimenta Doce Comprida. Em *Nicotiana rustica* foi verificado apenas o aparecimento de lesões de hipersensibilidade. A temperatura é um fator que também está envolvido na capacidade do vírus infectar a planta e da planta apresentar sintomas, todavia, no presente estudo, a temperatura talvez não tenha influenciado nessa questão, pois para a conclusão total do espectro de hospedeiras, 4 círculos foram feitos (dados não mostrados) em diferentes épocas do ano, no qual há variações significativas de temperatura. O resultado demonstrado no presente trabalho deve ser interpretado com cautela, pois é constatado de acordo com Resende et al., (1996),

que após poucas passagens mecânicas do vírus, dificilmente ele infecta hospedeiras da família cucurbitácea devido ao fato da perda da infectividade observada nos *Tospovirus* (Resende et al., 1992).

Sobre o aspecto sorológico, outros anti-soros policlonais contra a proteína N do ZLCV já foram produzidos. O trabalho de Resende et al., (1996) avaliou a reação cruzada do anti-soro com as espécies TSWV, TCSV, GRSV, INSV. Os autores observaram uma leve reação cruzada com as espécies GRSV, no entanto, considerada uma reação não significativa. Já no trabalho de Bezerra et al., (1999) não foi observada reação cruzada do anti-soro contra a proteína N do ZLCV com os vírus TSWV, TCSV, GRSV, INSV, IYSV-BR e CNSV. O anti-soro produzido contra ZLCV por Bezerra et al., (1999) foi utilizado no presente trabalho para a detecção do ZLCV em plantas de cucurbitáceas e em teste de reação cruzada. Através de Dot-ELISA e DAS-ELISA foi observada uma forte reação com os vírus GRSV, TSWV e TCSV, além da necessidade de uma titulação alta do vírus na planta para a sua detecção (Observação pessoal não demonstrada). Os resultados de reação cruzada observados nesta dissertação foram diferentes daqueles descritos por Bezerra et al. (1999) no trabalho publicado sobre a caracterização do ZLCV e CNSV. Devido a esta divergência e observado o aumento da incidência do ZLCV em plantações de cucurbitáceas (Dr. Jorge Rezende - ESALQ e Dr. Raimundo Aguiar - UFT, comunicação pessoal) tornou-se necessário a produção de um anti-soro para a detecção do ZLCV, foi proposto neste trabalho à produção de um novo anti-soro contra a proteína do nucleocapsídeo do ZLCV.

O novo anti-soro produzido apresentou uma reação cruzada forte com GRSV e menos intensa com TCSV nas diluições 1:10 e 1:100. No entanto, com TSWV não houve reação alguma, dado esse que difere dos resultados de sorologia feitos com outros anti-soros já produzidos para ZLCV em relação à reação cruzada com outras espécies de *Tospovirus*. No trabalho de Resende et al., (1996) não foi demonstrado reação significativa do anti-soro produzido a partir do isolado BR-09z com os demais *Tospovirus* avaliados, já com o anti-soro produzido neste trabalho, essa reação com GRSV foi considerada significativa, observada visualmente através de membranas de Dot-ELISA. Por problemas técnicos não foi possível comparar os resultados em DAS-ELISA para avaliar de

forma mais ampla os resultados de reação cruzada entre os anti-soros, no entanto, por Dot-ELISA (Figura 11) foi possível visualizar essa reação.

Conforme relatado, no trabalho de Bezerra et al., (1999), os dados apresentados foram distintos aos dados obtidos neste trabalho. Observamos reação cruzada do novo anti-soro com GRSV e TCSV, enquanto, Bezerra e colaboradores (1999) não observaram reação alguma entre todos os *Tospovirus* avaliados. Levantamos uma hipótese que talvez possa explicar essa questão: os epítomos da proteína N que serviram como base para produção de imunoglobulinas do anticorpo produzido anteriormente podem ter sido originados de regiões diferentes da proteína N daqueles usados para a produção do novo anti-soro.

O Genoma do ZLCV consiste de três segmentos de RNA como nos demais *Tospovirus*, segmentos S, M e L. O segmento M, responsável pela expressão da proteína de movimento viral (NSm) e as glicoproteínas (Gn, Gc) associadas a membrana lipídica do vírus, foi totalmente caracterizado (Nagata et al., 2007 & Silva et al., 2001). O segmento L responsável pela tradução da polimerase viral até o momento não foi sequenciado. Para o segmento S, a ORF da proteína N já foi caracterizada (Bezerra et al., 1999) e o gene da proteína NSs do ZLCV até o momento não havia sido caracterizado.

No presente trabalho a elucidação da sequência de nucleotídeos do gene da NSs responsável pela codificação da proteína supressora de silenciamento gênico foi concluída. Dentro do gênero *Tospovirus*, a grande maioria das espécies pertencentes, o segmento S já foi caracterizado. Alguns trabalhos avaliaram a filogenia entre as espécies do gênero *Tospovirus* com base em suas proteínas (N, NSm e G). Silva et al., (1999) com base na sequência de aminoácidos da proteína N e NSm, avaliaram a filogenia existente entre as espécies do gênero *Tospovirus* e constatou a existência de dois grupos distintos (grupo Americano e Euro-Asiático). Nagata (2007) e colaboradores, com base nas sequências de aminoácido das glicoproteínas dos *Tospovirus*, também observaram a separação das espécies em dois grupos. Para chegarem a esta conclusão, os dois trabalhos levaram em conta, não apenas, as análises de aminoácidos, mas também, a prevalência geográfica das espécies de *Tospovirus*.

No presente estudo, os dados de filogenia da NSs corroboraram com a análise feita com base na N, NSm e G. Na árvore filogenética da NSs (Figura

14) também é observado a evidente separação dos *Tospovirus* em dois grupos, Americano e Euro-Asiático. Um dado interessante pode ser observado nas árvores filogenéticas das proteínas N, G, NSm e NSs. Quando a análise é feita com as proteínas estruturais (N e G), CSNV e ZLCV estão mais próximos e quando a mesma análise é feita com base nas proteínas não estruturais NSm e NSs, esses vírus se separam e nitidamente ZLCV se mantém mais distante da maioria dos vírus do grupo Americano. Essa análise filogenética parece corroborar com a diferença biológica observada para o ZLCV, considerando-se a premissa, de que as proteínas não estruturais do vírus têm relação com a sua patogenicidade e sua interação com o hospedeiro. ZLCV apresenta uma gama de hospedeiras mais restrita que a maioria das outras espécies do grupo americano. Dessa forma, potencialmente, variações na sequência de aminoácidos dessas proteínas poderiam influir na relação do ZLCV com seus hospedeiros e/ou na sua patogenicidade.

Molecularmente é observado, através da identidade de aminoácidos da NSs (Tabela 3) e NSm (Silva et al., 1999) do ZLCV com demais *Tospovirus*, uma diferença mais significativa do ZLCV em relação aos demais vírus, a maior identidade observada com base na NSs foi de 73.2% com TSWV e com a NSm foi de 71% com CSNV. Tomando como comparação TSWV, observa-se, com base nas proteínas não estruturais, a maior identidade foi de 85,5% de TSWV com CSNV (análise feita com a NSm) e 82.5% de TSWV com TCSV (análise feita com a NSs). Uma diferença de mais de 10% é observada entre ZLCV e TSWV nas análises mencionadas acima.

Levanto em conta esse análise molecular poderíamos sugerir a hipótese que a restrição observada em relação às hospedeiras do ZLCV tem ligação com a divergência de aminoácidos observada dessas proteínas do ZLCV com as demais espécies do grupo Americano. No entanto, é necessária uma abordagem biológica com a construção de vetores expressando essas proteínas em planta para observar, se de fato, há uma relação convergente entre a base molecular e biológica.

Outra hipótese sugerida é que o vírus pode está, evolutivamente, se especializando na infecção de um grupo de hospedeiras. INSV é outro vírus do grupo Americano, no qual é observada uma restrição em nível de infecção de diferentes famílias botânicas, sendo observada uma restrição do vírus, a infecção de plantas ornamentais. Como em ZLCV, em INSV também é observado uma

variação em nível de aminoácidos das proteínas não estruturais, dessa forma, as modificações observadas no conjunto de aminoácido das proteínas não estruturais dos dois vírus, também podem estar ligadas a uma especificidade desses vírus em infectar um grupo restrito de plantas hospedeiras.

No gênero *Tospovirus*, a principal característica na demarcação das espécies é baseada na percentagem de identidade de aminoácidos da proteína N. Valores abaixo de 90% demarcam uma diferente espécie (Goldbach & Kuo, 1996). Também é avaliado como critério de classificação das espécies a especificidade do vetor, eficiência de transmissão do vetor, espectro de hospedeiras e a relação sorológica com base na proteína do nucleocapsídeo viral (N). Nos trabalhos de Silva et al., (1999); Nagata et al., (2007) e Lovato et al., (2004), os autores apontam que a classificação dos *Tospovirus* pode abranger outros parâmetros, tais como a comparação de sequência de aminoácidos das proteínas NSm e G e também da região intergênica (Pappu et al., 2000). Nessa dissertação é proposta também, a utilização das sequências de aminoácidos da proteína NSs como um fator adicional para a classificação taxonômica do gênero *Tospovirus*.

Sobre a análise de domínios em relação às proteínas supressoras de silenciamento gênico, alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos na busca de motivos das proteínas que tem relação com a supressão do silenciamento gênico. Recentemente foi descoberto o domínio putative Zn-Finger, está inserido em uma família proteica que possui atividade supressora (Chiba et al., 2005). Em membros do gênero *Potyvirus*, na proteína HC-Pro, foi observado a presença do domínio Zn-Finger que tem a capacidade, no processo de silenciamento gênico, de se ligar aos siRNAs formando complexos, e dessa forma impossibilitando a associação dos siRNAs ao complexo RISC (Valli et al., 2007). Ensaio com mutantes da proteína 2b de *Cucumber mosaic virus* (CMV) demonstraram que alterações em motivos de fosforilação da proteína não alteraram a sua interação com as proteínas AGO (González et al., 2010).

Em relação aos *Tospovirus*, até o momento, não foram desenvolvidos ensaios que avaliem a relação de domínios conservados da sequência de aminoácidos da NSs com o processo de supressão de silenciamento gênico. Neste trabalho, através da análise da sequência primária de peptídeo identificamos, por homologia de domínios específicos, sítios conservados nas sequências de

aminoácidos das proteínas NSs de *Tospovirus* (Anexo, Figura 15). Um total de seis domínios conservados nas sequências de proteínas foram observados, sendo que desses seis, três (N-miristoilação, tirosina kinase fosforilação e caseína kinase II fosforilação) se mantêm presentes, tanto em espécies pertencentes ao grupo Americano, quando em espécies do grupo Euro-Asiático. Além disso, esses domínios também estão presentes nas proteínas NSs em espécies pertencentes a outros 2 gêneros (*Orthobunyavirus* e *Phlebovirus*) da família *Bunyaviridae*.

Dos três domínios, o N-miristoilação foi observado em todas as espécies virais da família *Bunyaviridae* avaliadas (dados não apresentados). A miristoilação do N-terminal de proteínas em eucariotos é a transferência de uma cadeia lipídica (o miristato) pela enzima coA-miristoil : proteína Nmiristoil transferase (NMT) para o aminoácido glicina do terminal-N de uma determinada sequência na proteína. Evidências experimentais mostram que esta reação de transferência promove a associação de proteínas específicas entre si, como também com domínios na membrana, incluindo uma variedade de cascatas de transdução de sinal (Farazi, et al., 2001).

Além dessas regiões, no C-terminal das sequências primárias de aminoácidos das proteínas NSs alinhadas, foi observado um conjunto de 23 aminoácidos (Figura 15, região sublinhada em vermelho) que na sua maioria se mantêm conservados, tanto nos *Tospovirus* do grupo Americano como nos *Tospovirus* do grupo Euro-Asiático. Devida a grande conservação dessa região (única região do conjunto de aminoácidos que se observa altamente conservada nos dois grupos) levantamos a hipótese que provavelmente esta região possa ter alguma relação com o processo de silenciamento gênico, contudo, essa questão é apenas uma hipótese.

Para a confirmação desta função e da relação dessas regiões que se apresentam mais conservadas na sequência primária de aminoácidos com o processo de supressão de silenciamento gênico e também com a possível restrição em relação à infecção de plantas hospedeiras. Ensaio com vetores contendo a NSs mutada devem ser conduzidos, para avaliar a real função desses domínios com o processo de supressão do silenciamento gênico. E ensaios biológicos, como a co-inoculação de uma espécie de *Tospovirus* que tenha um amplo círculo de plantas hospedeiras com vetores expressando esses domínios da proteína NSs do ZLCV, para uma avaliação da relação da proteína NSs com restrição e/ou

amplitude de espécies de plantas hospedeiras também devem ser conduzidos. Os resultados obtidos com esses tipos de ensaios podem ser aplicados no controle de espécies de *Tospovirus*.

PERSPECTIVAS

Com a caracterização da proteína NSs do ZLCV e também com a caracterização das proteínas NSs de TCSV e GRSV (Dados ainda não publicados) e com as demais proteínas não estruturais (NSm e NSs), já caracterizadas dos principais *Tospovirus* brasileiros (TSWV, TCSV, GRSV, CSNV e ZLCV). Novos estudos mais aprofundados podem ser desenvolvidos levando em consideração a relação patógeno/hospedeira.

Estudos estes que podem abordar fatores envolvidos na supressão do silenciamento gênico, movimento viral célula a célula e sistêmico, tanto em plantas hospedeiras, plantas suscetíveis, inseto vetor e também em protoplastos. Os resultados adquiridos com esse tipo de estudo, podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle viral durante o processo de infecção. A elucidação da atuação dessas proteínas em etapas detalhadas, tanto no processo de movimento célula a célula e sistêmico (NSm) como no processo de supressão de silenciamento gênico (NSs) pode gerar conhecimento teórico que pode ser aplicado na produção de ferramentas químicas, biológicas e moleculares além da possível criação de plantas transgênicas resistentes a infecção viral. Favorecendo dessa forma, o aumento da produção agrícola no país, já que é relatado que as espécies virais do gênero *Tospovirus* estão entre os principais agentes causadores de doenças em plantas comercializáveis no mundo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, G.; YEH, S, D.; REDDY, D, V.; GREEN, S, K. Serological comparison of *Tospovirus* isolates from Taiwan and India with impatiens necrotic spot virus and different tomato spotted wilt virus isolates. Arch Virol, Volume 130, Issue 3-4, pages 237-50. 1993.

ADKINS, S.; QUADT, R.; CHOI, T, J.; AHLQUIST, P.; GERMAN, T. An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of tomato spotted wilt virus, a plant- and insect-infecting bunyavirus. Virology. 207(1):308-11. 1995.

ALTSCHUL, S, F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E, W.; LIPMAN, DJ. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410. 1990.

BEZERRA, I, C.; RESENDE, R, O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; ÁVILA, A, C. Increase of Tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new *Tospovirus* species, one from Chrysanthemum and one from zucchini. Phytopathology, St. Paul, v.89, n.9, p.823-830, 1999.

BRIGNETI, G.; VOINNET, O.; LI, W, X.; JI, L, H.; DING, S, W.; BAULCOMBE, D, C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana* EMBO J. 17, 6739-6746. 1998.

CARDOSO, A, I, I. Seed yield and quality in response to pollen load of squash cv. Piramoita. Bragantia 62:47-52. 2003.

CHAPMAN, E, J.; HILSON, P.; GEARMAN, T, L. Association of L protein and in vitro tomato spotted wilt virus RNA-dependent RNA polymerase activity. Intervirology. 46(3):177-181. 2003.

CHIBA, M.; REED, J, C.; PROKHNEVSKY, A, I.; CHAPMAN, E, J.; MAWASSI, M.; KOONIN, E, V.; CARRINGTON, J, C.; DOLJA, V, V. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. Virology, Volume 346, Issue 1, pages 7-14. 2006.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162:156-159. 1987.

CLARK, M, F. & ADAMS, A, N. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475 – 483. 1997.

BISHOP, D, H, L. Ambisense RNA genomes of arenaviruses and phleboviruses. *Advances in Virus Research* 31, 1-51. 1986.

BUCHER, E.; SIJEN, T.; DE HAAN, P.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. Negative-strand *Tospoviruses* and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology* 77:1329-1336, 2003.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D, G.; THOMPSON, J, D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31, 3497. 2003.

CORTEZ, I, J.; SAAIJER, K, S.; WONGJKAEW, A, M.; PEREIRA, R. GOLDBACH.; D. PETERS.; R. KORMELINK. . Identification and characterization of a novel *Tospovirus* species using a new RT-PCR approach. *Archives of Virology* 146(2): 265-278, 2000.

CUPERTINO, F, P.; LIN, M, T.; MUÑOZ, J, O. Perdas na produção de pimentão induzidas pelo vírus de vira-cabeça do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, (9):379. 1984.

CUPERTINO, F, P.; KITAJIMA, E, W.; FONSECA, M, E, N.; MEYER, N, C. Viroses em plantas olerícolas no Estado de Goiás. *Fitopatologia Brasileira* 13:101. 1988. (Resumo).

DE ÁVILA, A, C.; HUGUENOT, C.; RESENDE, R, O.; KITAJIMA, R, W.; GOLDBACH.; PETERS, D. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, 71, 2801-2807. 1990.

DE ÁVILA, A, C.; DE HAAN, P.; SMEETES, M, L, L.; RESENDE, R.O.; KORMELINK, R.; KITAJIMA, E, W.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Distinct levels of relationship between tospovirus isolates. *Arch Virol*, 128:211-227. 1993 A.

DE ÁVILA, A, C.; DE HAAN, P.; KITAJIMA, E, W.; KORMELINK, R.; RESENDE, R, O.; GOLDBACH, R, W.; PETERS, D. Characterization of a distinct isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. In the Netherlands. *J. Phytopathol.* 134:133-151. 1992.

DE ÁVILA, A, C.; DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R, O.; GOLDBACH, R, W.; PETERS, D. Classification of *Tospoviruses* based on

phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology* 74:153-159. 1993 B.

DE HAAN, P.; WAGEMAKERS, L.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *Journal of General Virology* 71, 1001-1007. 1990

DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; DE OLIVEIRA RESENDE, R.; VAN POELWIJK F.; Peters, D.; GOLDBACH, R. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J Gen Virol.* (72): 2207-16. 1991.

DEKKER, E, L.; PORTA, C.; VAN REGENMORTEL, M, H, V. Limitations of different ELISA procedures for localizing epitopes in viral coat protein subunits. *Archives of Virology* 105, 269-286. 1989.

ELLIOTT, R, M. Nucleotide sequence analysis of the small (S) RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *Journal of General Virology* 70, 1281-1285. 1989.

ELLIOTT, R, M. Molecular biology of the Bunyaviridae. *Journal of General Virology* 71, 501-522. 1990.

FARAZI, T, A.; WAKSMAN, G.; GORDON, J, I. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem*, Vol 276, Issue 43, p. 39501-4. 2001.

FAUQUET, C, M.; MAYO, M, A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALI, L, A. *A Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press. 2005.

FIRE, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.*15: 358–363. 1999.

GATTIKER, E.; GASTEIGER, A.; BAIROCH, A. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl. Bioinform.* 1, 107 . 2002.

GIAMPAN, J, S.; REZENDE, J, A, M.; SILVA, R, F. Reaction of cucurbits species to infection with *Zucchini lethal chlorosis virus*. *Scientia Horticulturae*, V.114, P.129–132, 2007.

GIAMPAN, J, S.; REZENDE, J, A, M.; PIEDADE, S, M, S. Danos causados pelo *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) sobre a produção de frutos comerciais de abobrinha de moita “Caserta”. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.3, p.223-225, 2009.

GOLDBACH, R.; KUO, G. International Symposium on *Tospoviruses* and Thrips of Floral and Vegetable Crops. *Acta Horticulturae*. 431:21-26. 1996.

GOLDBACH, R. & PETERS, D. Molecular and biological aspects of tospoviruses. In *The Bunyaviridae*, pp. 129–157. Edited by R. M. Elliott. New York, NY: Plenum Press. 1996.

GONZÁLEZ ET AL. Cucumber Mosaic Virus 2b Protein Subcellular Targets and Interactions: Their Significance to RNA Silencing Suppressor Activity. *Molecular plant-Microbe interactions*. Volume 23, Number 3. Pages 294-303. 2010.

GUO, S. & KEMPHUES, K.J. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611-20. 1995.

HAMMOND, J. & JORDAN, R, L. Dot blots (viruses) and colony screening *in*: Hampton, R.; Ball, E. & De Voer, S. eds. *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens*. APS Press. P. 237-248. 1990.

HASSANI-MEHRABAN, A, B.; BRENKMAN, N, J, F.; VAN DEN BROEK.; ROB GOLDBACH.; KORMELINK, R. RNAi-Mediated Transgenic *Tospovirus* Resistance Broken by Intraspecies Silencing Suppressor Protein Complementation. *MPMI* Vol. 22, No. 10, p. 1250–1257, 2009.

HUGUENOT, C.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G.; DE HAAN, P.; WAGEMAKER, C, A, M.; DROST, G, A.; OSTERHAUS, A, D, M, E.; PETERS, D. Detection of tomato spotted wilt virus using monoclonal antibodies and riboprobes. *Arch Virol*. 110, 42-62. 1990.

IBGE (Brasília, DF). Banco de dados agregados. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=5&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>> Acesso em: 16 de mar. de 2011.

KITAJIMA, E, W. & COSTA, A, S. *Cienc. Cult.* **24**: 542. (1972).

LAW, M, D.; SPECK, J.; MOYER, J, W. Nucleotide sequence of the 3' non-coding region and N gene of the S RNA of a serologically distinct *Tospovirus*. *J Gen virol* 72: 2597-2601. 1991.

LI, H.; LI, W, X.; DING, S,W. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, 1319-1321. 2002.

LIMA, J, A, A.; VALE, C, C.; MIRANDA, A, C, M, M.; OLIVEIRA, V, B. Identificação sorológica do ZYMV em plantios de melão no Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira* 21: 426. 1996. (Resumo).

LOVATO, F, A.; NAGATA, T.; DE OLIVEIRA, R, R.; DE AVILA, A, C.; INOUE-NAGATA, A, K. Sequence analysis of the glycoproteins of Tomato chlorotic spot virus and Groundnut ringspot virus and comparison with other *Tospoviruses* *Virus Genes* 29, 321 (2004).

MOHAMED, N, A.; RANGLES, J, W.; FRANCKI, R, I, B. Protein composition of Tomato spotted wilt virus. *Virology* 56, 12–21. 1973.

MONTEIRO, C, R.; LAURENDE, A, M.; ZICCHI, A, R. Espécies de *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae) de importância agrícola no Brasil. *Neotropical Entomology*. (1):65-72. 2001.

MONTES-HERNANDEZ, S. & EGUIARTE, L, E. Genetic structure and indirect estimates of gene flow in three taxa of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) in western Mexico. *American Journal of Botany* 89:1156-1163. 2002.

NAGATA, T.; RESENDE, R, O.; KITAJIMA, E, W.; COSTA, H.; INOUE-NAGATA, A, K.; ÁVILA, A, Z. First report of natural occurrence of *Zucchini lethal chlorosis Tospovirus* on cucumber and Chrysanthemum stem necrosis *Tospovirus* on tomato in Brazil. *Plant Disease*, St. Paul, v.82, p.1403, 1998.

NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A, K.; SMID, H, M.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt *Tospovirus*. *J Gen Virol*. (80):507-15. 1999.

NAGATA, N.; CARVALHO; SODRÉ, R, A.; DUTRA, L, S.; OLIVEIRA, P, A.; NORONHA, E, F.; LOVATO, F, A.; RESENDE, R de O; De ÁVILA, A, C.; INOUE-NAGATA, A, K. The glycoprotein gene of Chrysanthemum stem necrosis virus and Zucchini lethal chlorosis virus and molecular relationship with other *Tospoviruses*. *Virus Genes*, 35:785–793. 2007.

NAKAHARA, S.; MONTEIRO, R, C.; *Frankliniella zucchini* (Thysanoptera: Thripidae), a new species and vector of *Tospovirus* in Brazil. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, Washington, D.C., (101):290-294. 1999.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* 2:279-89. 1990.

PAPPU, S, S.; BHAT, A, I.; PAPPU, H, R.; DEOM, C, M.; CULBREATH, A, K. Phylogenetic studies of *Tospoviruses* (family: Bunyaviridae) based on intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. *Arch Virol*, Volume 145, Issue 5, pages 1035-45. 2000.

PETERS, D. Un updated list of plant species susceptible to tospovirus. . In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TOSPOVIRUSES AND THRIPS IN FLORAL AND VEGETABLE CROPS, 4., 1998, Wageningen, The Netherlands. Recent progress in tospovirus and thrips research: abstracts of papers and poster presentation. Wageningen: Experimental Plant Sciences/Production Ecology, 1998. p.107-109.

PETERS, D. & GOLDBACH, R. Tomato spotted wilt RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology* 72, 2207-2216. 1991.

RESENDE, R, O.; DE HAAN, P.; VOSSSEN, E, V.; DE ÁVILA, A, C, GOLDBACH, R.; PETERS, D. Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. *Journal of General Virology*, 73: 2509-2516. 1992.

RESENDE, R.O.; POZZER, L.; NAGATA, T.; BEZERRA, I, C.; LIMA, M.I.; GIORDANO, L, B.; KITAJIMA, E, W.; ÁVILA, A, C. New *Tospoviruses* found in Brazil. *Acta Horticulturae*, Amsterdam, n.431, p. 78-89, 1996.

REZENDE, J, A, M.; GALLETI, S, R.; SCAGLIUSI, S, M, M.; POZZER, L.; RESENDE, R, O.; DE ÁVILA, A, C. Incidência e algumas características biológicas e serológicas de um *Tospovirus* em abobrinha de moita em São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.343-344. Suplemento. Resumo. 1995.

REZENDE, J, A, M.; GALLETI, S, R.; POZZER, L.; RESENDE, R, O.; DE ÁVILA, A, C.; SCAGLIUSI, S, M, M. Incidence biological and serological characteristics of a *Tospovirus* in experimental fields of zucchini in São Paulo state, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília. V.22, n.1, p.92-95, 1997.

ROBINSON, R, W. & DECKER-WALTERS, D, S. Cucurbits. Wallingford: CAB international, 226p. 1997.

ROBINSON, R, W. & DECKER-WALTERS, D, S. Cucurbits. CAB International, Wallingford, Oxon. 1999.

SÁ, P, B. & KITAJIMA, E, W. Characterization of an isolate of watermelon mosaic virus 2 (WMV-2) from Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 16: 217-223. 1991.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E, F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANGER, F., NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings National Academy of the Science* 74:5463-5467. 1977.

SILVA, M, S.; MARTINS, C, R, F.; BEZERRA, I, C.; NAGATA, T.; DE AVILA, A, C.; RESENDE, R, O. Sequence diversity of NSm movement protein of *Tospoviruses*. *Archives of Virology*, Austria, v. 146, n. 7, p. 1267-1281, 2001.

SILVEIRA JUNIOR, W, G.; DE ÁVILA, A, C.; MUNOZ, J, O. Chuchu (*Sechium edule* Sw.): nova hospedeira do vírus de vira-cabeça do tomateiro (TSWV). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.10, p.661-665, 1985.

STANGARLIN, O, S.; DIAS, P, R, P.; BURIOLLA, J, E.; REZENDE, J, A, M. Incidência de viroses em ensaios de avaliações de genótipos de abóboras de pepino na região de Dourados/MS. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.26, p.531, Suplemento. Resumo. 2001.

TAKEDA, A.; SUGIYAMMA, K.; NAGANOB, H.; MORIC, M.; KAIDOA, M.; MISEA, K.; TSUDAB, S.; OKUNOA, T. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Letters*, Volume 532, Issue 2, Page 75. 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; Kumar, S. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. 2007.

VALLI, A.; DUJOVNY, G.; GARCIA, J, A. Protease Activity, Self Interaction, and Small Interfering RNA Binding of the Silencing Suppressor P1b from *Cucumber Vein Yellowing Ipomovirus*. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 974–986 Vol. 82, No. 2. 2008.

VAN DER KROL, A, R.; MUR, L, A.; BELD, M.; MOL, J, N, M.; STUITJE, A, R. Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2:291-9. 1990.

VAN DE WETERING, F., GOLBACH, R. & PETERS, D. Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology* 86:900-905. 1996.

KNIPPENBERG, V.; GOLDBACH, I.; KORMELINK R, R. Purified tomato spotted wilt virus particles support both genome replication and transcription in vitro. *Virology*. 303(2):278-86. 2002.

WANG, M. & GONSALVES, D. ELISA detection of various tomato spotted wilt virus isolates using specific antisera to structural proteins of the virus. *Plant Dis.*, v.74, n.2, p.154-158, 1990.

WIJKAMP, I., VAN LENT, J., KORMELINK, R., GOLDBACH, R.; PETERS, D. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology* 74:341-349. 1993.

YUKI, V, A.; REZENDE, J, A, M.; KITAJIMA, E, W.; BARROSO, P, A, V.; KUNIYUKI, H.; GROppo, G, A.; PAVAN, M, A. Ocurrence, distribution and relative incidence of viruses infecting cucurbitis in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, st. Paul, v.84, n.5, p.516-520, 2000.

ANEXO

```

TCSV      1  -----MSISVYESIIQTKAS
INSV      1  -----MSSAMYETIIKSKSS
GRSV      1  MVDLQAAANSLVIPGSRAIVSFFILNRTSTSKSQNCNKHKSTRATMSISGVYESIIQTKAS
TSWV      1  -----MSSSVYESIIQTRAS
CSNV      1  -----MSLSVYDSIIQTKAS
ZLCV      1  -----MSSMYDSIIQAKAS
IYSV      1  -----MSIVRTTAVDFLSN-
GTV       1  -----MSSVKSAASEFVK-
CaCV      1  -----MSTAKSAASEFVK-
WBNV      1  -----MSTALSVASEFVIS-
GBNV      1  -----MSTARSAASEFVK-
WSMV      1  -----MSTAKNAASEFVK-
MYSV      1  -----MANAYLTAAGYVKA-
consensus 1  -----* . . . . .

```

```

TCSV      16  VWGSTASGKSVDSYWIYEFATGSPLVQTOIYSDSRKSSFGY--TSRIGDIPVVEEIL
INSV      16  IWGTTSSGKAVDSYWIHDQSSGKKLVEAQLYSDSRKISFCY--TGKVGFLPTEEKEII
GRSV      61  VWGSTASGKSVDSYWIYEFPTGSPLVQTOIYSDSRKSSFGY--TSKVGDI PAVEEEIIL
TSWV      16  VWGSTASGKAVDSYWIHELCTCSQLVQTOIYSDSRKSSFGY--TAKVGDL PCEEEIIL
CSNV      16  VWGSTASGKSVDSYWIHELETGSSLVQTOIYSDSRKSSFSY--TTRVGDLPCEEKEIF
ZLCV      16  VLGSTSSGKSVDSYWIHNYTNCASLIQTOIYSDSRKSSFN--TSKVGDL PNEEREIIL
IYSV      15  -YGISCDRFRSSNDCYRVFS-GNGKILMDVSMHSTIGIKPAFSGNLGRNEDIKANEAEI
GTV       15  -YGT-RDNRAINDCYSVFN-GEQVNFNLFMHNNAGIKSAFSLNDLGRNEDIKTHEAEI
CaCV      15  -YGT-RDNRAINDCYSVFS-GEQVNFNLFMHNNAGIKSAFSLNDLGRNEDVKTHEAEVI
WBNV      15  -YVT-GDDVPPDDCCSIFSGEGANFLDFMHNIAGMKSAFNLSYLYLNDITTHEPEDI
GBNV      15  -YGT-RDNRAINDCYSVFS-GEQVNFNLFMHNNAGIKSAFSLNDLGRNEDIKTHEAEVI
WSMV      15  -YGT-RDNRAINDCYSVFT-GEQVNFNLFMHNNAGIKSAFSLNDLGRNEDVKTHEAEVV
MYSV      15  -YGS-KDKKAMNDCYAVFD-GEQKNILNLFMHSNSGVKSAFSLNELGRNEDMKIQEAETL
consensus 61  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * * . .

```

```

TCSV      74  SQNLHVPIFDIDDFSININLSLIVLVCVSNIVNTNGVKHOGHLKVLSPAQLHPFIEP----
INSV      74  SENFVPIFDIDDFNFSFGDVEIIVFSNITNTNGVKHOGHLKVLSSQLLRMFEE----
GRSV     119  SQNVHIPVFDIDDFSISINDFIATSACSNI VNTNGVKHOGHLKVLSPAQLHPFIEP----
TSWV      74  SQHYIPIFDIDDFSINIDNSVIALSVCSNI VNTNGVKHOGHLKVLSPAQLHSIES----
CSNV      74  SQHVYIPVFDIDDFNISIDFSLVMSVCSNI VNTNGVKHOGHLKVLSPAQLHSIGS----
ZLCV      74  SQNAFIPIFDIDDFCIIDDESIDLSTCSNI VNTNGVKHOGHLKVLSSAQLDPIEH----
IYSV      73  DEYHNYDVFNFKFLDISFONHFMETSVKPKSIKNYETKFMHNQIFEPSTQLLRQGMG--
GTV       72  DTCHDYNYFEKFLDITFCHEHMSLVVRKPGVKNTGCKFSMHNQIFENPNSGTL SIAPR--
CaCV      72  DTCHDYNYFEKFLDITFCHEHMSLVVRKPGVKNTGCKFSMHNQIFENPNSDVL DLAPR--
WBNV      72  ESCHDYHYFEKFLDITFCHEHMSLVVRKPGVKNTGCKFAMHNQIFENPNSDVL DLAPR--
GBNV      72  DSCHDYHYFEKFLDITFCHEHMSLVVRKPGVKNTGCKFTMHNQIFENPNSDVL LALTPG--
WSMV      72  DSCHDYHYFEKFLDITFCHEHMSLVVRKPGVKNTGCKFTMHNQIFENPNSN ILMTPG--
MYSV      72  TILHDQKFNHFLDMLFCGHVNLVIVKHNVSNIGCKFSQHLNLFPCNEETLDFTP TDK
consensus 121  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

```

```

TCSV      130 --VMSRSDIVSRFFLQEEDITPNDKYIDAANKGSLSCVKEHTYKVMNHNQALGKVVNLS
INSV      130 --QIAPVEITSRFLKESDIFPPNFI EAANKGSLSCVKEVLEVDVKYSNNQSMGKVS VLS
GRSV      175 --VMSRSEIASRFFLQEEDITPDDKYISAANKGSLSCVKEHTYKVMMSYNQALGKVVNLS
TSWV      130 --IMNRSIDITRFQLQEKDITPNDKYIEAANKGSLSCVKEHTYKIEICYNQALGKVVNLS
CSNV      130 --IMSISDITDRFQLQEKDITPNDRYIEAANKGSLSCVKESTYEVKMCNQAALGKVVNLS
ZLCV      130 --LMSRSDISSRFFLKEEDITPKDRYIEAANKGSLSCVKEQTYEVKVCNQAALGKVVNLS
IYSV      131 --KMTESDFYYSNLSKDEIYENEFVSEAKKNFFADVSGFSLDYG-FSVMGKTSYW
GTV       130 --MVL EEGFHEKSKIKPNELLPSDWCLDECFWKNNEFYIATNGNEALDYG-FSVMGKTSYW
CaCV      130 --TIQEEVFHEKSKIRSNLPSDWCLDECFWKNNEFYIATNGEESLDYG-FSVMGKTSYW
WBNV      130 --TISEDIFYEKSKIRPSGMAPSGWCLDECRENNFYIAANGKLALDYG-FSVMGKTSYW
GBNV      130 --TVSENEFYEKIKIRSNGLPSGWCLDECKKNNEFYIATNGDLTLDYG-FSVMGKTSYW
WSMV      130 --TISEDIFYEKSIRSKIASGGLPSGWCLDECYKNNEFYIATNGDLTLDYG-FSVMGKTSYW
MYSV      132 GLSLSSEEFKATKISSDFHQGWCVHECKKNRFVVAETSCELELDNYG-SPIMGKT VAYW
consensus 181  . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * * . .

```


| | | | | | | | | | |
|-----------|-----|------|-------------|----------|-----------------|--------|---------|---------|-------|
| TCSV | 419 | PSWK | MDFAKGEIRIS | POAASSSI | ----- | | | | |
| INSV | 419 | PDWK | FDYAAGEIKIS | PRSEDV | LKAISKLDLN----- | | | | |
| GRSV | 464 | PSWK | IDFARGEIRIS | POSTPIAR | SLKLDLSKI | KEKKS | LIWETSS | YDLE | |
| TSWV | 419 | PSWK | IDFARGEIKIS | POSISVAK | SLKLDLSG | IKKESK | VKEAYAS | GSK | |
| CSNV | 416 | PSWK | VDFARGEIKIS | POSISVAK | SLALDLSG | IGKKK | SKAPAGS | QPEPK | |
| ZLCV | 419 | PSWK | IDFARGEIKIS | PRSPSFL | KWLVKLD | DIDEIG | RRRPRF | SEAHKSG | GSK |
| IYSV | 426 | SCWK | ESKGLGH | FTVEELQ | ----- | | | | |
| GTV | 423 | IVWK | ESLEHQH | FIVELQ | ----- | | | | |
| CaCV | 423 | TLWK | ESLEHQH | FIVELK | ----- | | | | |
| WBNV | 423 | TQWR | ECLHRHF | VVTAN | ----- | | | | |
| GBNV | 423 | IQWE | ESLEHQH | FIVKPE | ----- | | | | |
| WSMV | 423 | IQWK | ECLHRHF | VVKAE | ----- | | | | |
| MYSV | 427 | PFWK | EFPEQHL | VVDYNE | FSERYLN | SSSDSE | EEEPST | SAPSTS | ----- |
| consensus | 481 | . | *.. | | | | | | |

Figura 15- Alinhamento múltiplo de aminoácidos das proteínas NSs de *Tospovirus*. Cada cor referente a cada nome condiz com a cor de cada marcação na figura. ATP/GTP-binding site motif A (P-loop), Casein kinase II phosphorylation, N-myristoylation, Tyrosine Kinase Phosphorylation, Protein Kinase C Phosphorylation, N-glycosylation. Aminoácidos no C-terminal sublinhados em vermelho representam região consenso entre o grupo Americano e Euro-Asiático. Regiões marcadas em escuro representam conservação dos aminoácidos entre as espécies de *Tospovirus*. Regiões marcadas em cinza representam conservação de alguns aminoácidos entre as

A

atgtcttcaagcatgtatgactctatcatccaggcaaaagcttcagtcttgggatcaacatcttcgggtaagtctgttgta
gattcttattggatccacaactacacaaatgggtgcttcttaattcaactcaattatattctgattcaaggagcaaaagca
gcttcaactataacctcaaaagtggtgatctccctaatgaagagagagagatcctctctcaaaatgcttcatccctatfff
tgatgatatagatttctgtatcaccattgatgatgagctttagatctttcaatctgctccaacactgttaacactaatggagt
gaagcatcaggacacctaaagtcctttcatctgcacaactgatccatcagcatctgatgagccgatctgacattf
cttctagatttcatctgaaagaagaggatataatacctaaggacaggtacatagaagcagctaacagaggctctctttct
tgtgtcaaggagcagacttatgaagttaaagctgccacaaccaagctttagggaaagtgaatgttcttctcctaacag
aatgttcatgaatgcctatacagcttcaaaccaactcaatcaagttgagagcaacaacaggactgtaaattctcttg
caattaaatcacttctatgtctgtcaaaaatgagataatgcctaactctcaggcttttcttagcatttcgactgatgctgatt
tcaaaagtgaatffffgctgagaatacccagggtcctgaaacaagttaatttcagaaattattcaaaattgctgaagaca
cctcaacaagaatfffftctgtcaattgcttgccttagccacagcagtggtgaaactgctttaaataacgattatff
gcaagcattgaaaccgactccagagatfffctctttttgagctcaaaatggccttttctgacttgaaggaaccatacag
tgctgttcatgatcctcatattcccatagaattgccatgcactgcttgaactcacacatccttgcacaatctctttgtg
ataagctcaggaagatgttataatttctttaaacaacctgagctgtttccaatgaagctggatgttggtggaagaa
ctttaaactactgaaagatgcttataaaaggaatatttctcagaactctagaatgccttctgtaaacatgcagac
tatacttatttggagagcattcaaatccctcatggaaaattgatttggcagaggagaaattaagatttctccaaggtctc
cttcttttgaagtgggtgtaaaagcttgatattgatgaaataggcaggaggaggccaaggtttctgaagcacacaaa
tctggttcgaaatag

B

MSSSMYDSIIQAKASVLGSTSSGKSVVDSYWIHNYTNGASLIQTQLYSDSR
SKSSFNYTSKVGDLPNEEREILSQNAFIPIFDDIDFCITIDDESLLDLSICSNTV
NTNGVKHQHGLKVLSSAQLDPIEHLMSRSDISSRFHLKEEDIIPKDRYIEAA
NRGSLSCVKEQTYEVKVCHNQALGKVNVLSPNRNVHECLYSFKPNFNQV
ESNNRTVNSLAIKSLLMSVKNEIMPNSQAFASISTDADFKVNFVLRIPRVL
KQVNFQKLFKIAEDTSNKDFYLSIACIPSHSSVETALNVTIICKHLKPTPEIL
SFFELKMAFSDLKEPYSAVHDPYSYSHRIAHALLEHTSFAQSLCDKLQEDV
IIYSLNHELFPMKLDVGGRTLNYSEDAYKRKYFISSETLECLPANMQTISY
LESIQIPSWKIDFARGEIKISPRSPSFLKWLKLDIDEIGRRRPRFSEAHKSGS

K*

FIGURA 16 – **A** Sequências de nucleotídeos da ORF NSs do ZLCV, **B** – Sequências de aminoácidos da ORF NSs do ZLCV.

Figura 17 - Círculo de plantas hospedeiras. Plantas inoculadas com ZLCV sintomáticas, os sintomas foram avaliados inicialmente após 15 dias da segunda inoculação.





A = *N. tabacum* “TNN” (DF, EB, RC e LC); **B** = *N. tabacum* “Sansun” (EB, LN e DF); **C** = *N. rustica* (RH); **D** = *D. stramonium* (LC e CN); **E** = *C. pepo* cv. “Caserta” (M, MP e EF); **F** = Pimenta doce comprida (DF e C); **G** = Pepino caipira (M, EF, NF e MP); **H** = Melancia “Crimson Sweet” (C, DF, NF e MP); **I** = Pepino Safira (M, NF e MP); **J** = Pepino Verde Comprido (M, EF, NF e MP); **K** = *Gomphrena globosa* (RC, LC e DF); **L** = *N. benthamiana* (RC, EF, NF e MP).
 (RH) Reação de hipersensibilidade (LC), lesão necrótica (LN), mosaico (M), clorose (C), deformação foliar (DF), morte da planta (MP), redução do crescimento (RC), clareamento de nervuras (CN), embolhamento foliar (EB), encarquilhamento foliar (EF), necrose foliar (NF).