UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

# CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DO Lettuce mottle virus (LeMoV) EM ALFACE E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DE VÍRUS EM JASMIM ESTRELADO

**MILENA LEITE DE OLIVEIRA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

**BOTUCATU – SP**
**Novembro – 2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

# CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DO Lettuce mottle virus (LeMoV) EM ALFACE E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DE VÍRUS EM JASMIM ESTRELADO

**MILENA LEITE DE OLIVEIRA**

Orientadora: Prof. Dra. Renate Krause Sakate

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

**BOTUCATU – SP**

**Novembro – 2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Oliveira, Milena Leite de, 1985-
O48c Caracterização biológica e molecular do *Lettuce mottle virus* (Le MoV)em alface e sequeciamento de nova geração de vírus em jasmim estrelado / Milena Leite de Oliveira. - Botucatu : [s.n.], 2016
x, 95 f. : fots. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Renate Krause Sakate
Inclui bibliografia

1. Alface - Doenças e pragas. 2. Sequenciamento de nucleotídeo. 3. Vírus de plantas. I. Sakate, Renate Krause. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**Câmpus de Botucatu**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DO Lettuce mottle virus (LeMoV) EM ALFACE E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DE VÍRUS EM JASMIN ESTRELADO"

**AUTORA: MILENA LEITE DE OLIVEIRA**
**ORIENTADORA: RENATE KRAUSE SAKATE**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE
Depto de Proteção Vegetal / UNESP - Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu

Prof. Dr. MARCELO AGENOR PAVAN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas

Profa. Dra. KELLY CRISTINA GONÇALES ROCHA
Depto. Engenharia / União das Faculdades dos Grandes Lagos

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu

Dra. DAIANA BAMPI
Depto. Fitopatologia e Nematologia / Esalq - USP

Botucatu, 11 de novembro de 2016.

À minha mãe, Rita de Cássia,
Ao meu pai, Ademir,
Aos meus irmãos Mateus e Marcos,
Ao meu noivo José Marcelo Soman,
Aos meus avós, Elza e Antônio Brasílio,
À minha querida vó Alzira,
E acima de tudo a Deus.

**DEDICO**

*“If you can’t fly then run,*
*if you can’t run then walk,*
*if you can’t walk then crawl,*
*but whatever you do*
*you have to keep moving forward”*

Martin Luther King Jr.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que ele tem me proporcionado, por todo aprendizado, vitórias, conquistas, superações, bem como, por todos os obstáculos, desafios e dificuldades vividas, esses me fizeram mais forte.

Agradeço aos meus pais, Ademir e Rita de Cássia, por todo amor, dedicação, apoio e incentivo; graças a vocês estou realizando mais uma etapa dos meus estudos, vocês são os grandes responsáveis por tudo que sou e por tudo que conquistei até o momento.

Ao meu noivo José Marcelo Soman, pelo amor, carinho, companheirismo, cumplicidade, paciência e por sempre estar presente, me ouvindo, me aconselhando, me ajudando e sempre me apoiando nas minhas decisões.

Aos meus irmãos Mateus e Marcos Vinícius, pelo amor, carinho amizade e companheirismo.

Aos meus avós, Antonio Brasilio e Elza Andrade, por todo amor, carinho e atenção.

À Faculdade de Ciências Agronômicas-FCA/UNESP, por todo suporte aos alunos, por toda a estrutura de trabalho, sendo assim possível a realização do curso de Pós-graduação.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

À Prof. Dra. Renate Krause Sakate pela orientação, amizade, paciência e compreensão ao longo desses anos de doutorado.

Aos professores Antonio Carlos Maringoni, Marcelo Agenor Pavan, Carlos Gilberto Raetano e Silvia Renata S. Wilcken, pela formação e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório Letícia, João César, Daiana, Késsia, Cristiane, Mônika, Leyzimar, Bruno, Davi, Leonardo, Júlio, Martha, Tatiana, Gerson, Luis, Guilherme,

Vinícius, Gabriel, Rafaela, Paulinha por todo companheirismo nos momentos de trabalho e também fora dele.

Ao professor Dr. Valdir Yuki, por contribuir com o trabalho ao realizar a identificação dos pulgões e ceder colônias de *Myzus persicae* pré estabelecida em plantas de nabo forrageiro.

À Rafaela Morando e ao Prof. Dr. Edson L. Baldin, por cederem os pulgões da espécie *Aphis gossypi* para a realização do teste de transmissão.

Ao Dr. Michael John Melzer, por me aceitar em seu laboratório na Universidade do Hawaii em Manoa no período de oito meses, e pela sua dedicação, ensinamento e paciência.

Aos amigos que fiz nessa curta jornada no Hawaii, Miriam Long, Adam Park, Riten, Brandi, Amber, Glori, Kishore, Hana, Christie, Meredith, Aoi, Momoko, uncle Clyde, Sharon, Inise, Irma, Paz, Aya, Carlye e Jared, Julie, Renee, a todos que fizeram parte desses momentos inesquecíveis.

Aos produtores e engenheiros agrônomos que cederam sua área e seu tempo, respectivamente, para coleta das amostras.

Aos meus queridos amigos Taísa e Ricardo, Samuel e Christianne, pela amizade, parceria, pelos bons momentos de descontração.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram dessa conquista.

# SUMÁRIO

**Página**

LISTA DE TABELAS E FIGURAS ..... VIII
1. RESUMO ..... 1
2. SUMMARY ..... 3
3. INTRODUÇÃO ..... 5
4. REVISÃO DE LITERATURA ..... 7
4.1 Aspectos gerais da cultura da alface ..... 7
4.1.1 Viroses em Alface ..... 8
4.1.1.1 Vira-cabeça - Gênero *Tospovirus* ..... 8
4.1.1.2 *Lettuce mosaic virus* (LMV) - Gênero *Potyvirus* ..... 9
4.1.1.3 Lettuce mottle virus (LeMoV) - Gênero *Sequivirus* ..... 11
4.1.2 Características e Critérios Taxonômicos da Família *Secoviridae* (Ordem Picornavirales) ..... 12
4.1.3 Domínios Conservados – Família *Secoviridae* (Ordem *Picornavirales*) ..... 14
4.1.4 Transmissão de vírus ..... 16
4.1.4.1 Transmissão de vírus por sementes ..... 16
4.1.4.2 Transmissão de vírus por vetores ..... 17
4.2 Jasmim estrelado – Família Oleaceae e suas viroses. ..... 20
4.2.1 Família *Tombusviridae* ..... 20
4.3 Sequenciamento de Nova Geração aplicado à Virologia Vegetal ..... 22
CAPÍTULO I: ..... 34
"CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DO Lettuce mottle virus (LeMoV) EM ALFACE" ..... 34
CAPÍTULO II ..... 65
"SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DE VÍRUS EM JASMIM ESTRELADO" ..... 65
5. CONCLUSÕES ..... 84
Apêndice 1 ..... 86
Apêndice 2 ..... 87
Apêndice 3 ..... 94

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Página**

**Figura 1**. Organização genômica do gênero *Sequivirus*..... 11

**Figura 2**. Árvore filogenética de membros da família *Secoviridae* baseada na sequencia de aminoácidos com domínios conservados, entre o motivo "CG" da 3C-like proteinase e o motivo GDD da polimerase (região Pro-Pol)..... 13

**Figura 3**. Capsídeo (Pseudo-T=3) dos vírus ''picorna-like''. À esquerda, o canônico beta-barril (''jelly-roll''), contendo 8 beta-sheets e duas alpha-hélices; no meio estão os três jelly-rolls, proteoliticamente separados ou não, estando montadas em capsômeros individuais. À direita, seis desses protomeros estão montados formando o capsídeo icosaédrico. No topo, as subunidades da CP (VP1, VP2 e VP3, correspondendo aos domínios CP1, CP2 e CP3, respectivamente) exemplo: *Cheravirus*, *Torradovirus*, *Sequivirus* e *Waikavirus*; no meio duas subunidades da CP (S de "small" e L de "large"), exemplo: *Comovirus*, *Fabavirus* e *Sadwavirus*, e na parte inferior uma unidade única da CP, *Nepovirus*..... 15

**Figura 4.** Representação esquematica do genoma do RrLDV e a provável estratégia de tradução. ORF 1, 2 e 5 são lidas na fase de leitura, frame 1, ORF 3 e 6 na frame 2 e ORF 4 na frame 3..... 22

## CAPÍTULO 1

**Tabela 1**. Período, número de amostras e localidade de plantas sintomáticas coletadas durante setembro de 2013 a maio de 2015..... 41

**Tabela 2.** Sequências dos oligonucleotídeos para detecção do LMV (PEYPELUT et al, 2004), LeMoV (JADÃO et al., 2007) e gênero *Tospovirus* (EIRAS et al., 2001)..... 43

**Tabela 3.** Sequências dos pares de oligonucleotídeos obtidos para amplificação do genoma do LeMoV..... 47

**Tabela 4**. Sequência dos oligonucleotídeos, Gene Specific Primer (GSP), utilizados no método de RACE..... 49

**Tabela 5.** Relação das amostras positivas para LMV, LeMoV e Tospovirus..... 50

**Tabela 6**. Porcentagem de identidade de nucleotídeos para região parcial codificadora

da polimerase (RNA dependente de RNA polimerase – RdRp) entre os isolados de LeMoV disponíveis no GenBank (DQ675190.1; DQ675191.1; AM039965.1) e outras espécies de sequivirus disponíveis no GenBank (NC_003628, EU980442 e DQ675185)..... 58

**Figura 1**. Plantas de alface com sintomas típico de mosaico, infectadas por LeMoV..... 43

**Figura 2**. Teste de transmissão do LeMoV com *A. gossypii*, ensaio I. *A. gossypii* mantidos em planta de feijoeiro (A). *A. gossypii* durante período de aquisição viral em plantas sabidamente infectadas com LeMoV (B)..... 45

**Figura 3**. Teste de transmissão com *M. persicae,* ensaio I. Período de aquisição viral em plantas sabidamente infectadas com LeMoV (A). Plantas de alface trocadero sadias submetidas a presença de pulgões previamente utilizados na aquisição do LeMoV (B)..... 45

**Figura 4**. Teste de transmissão com *A. gossypii*, ensaio II. Telados antiafídeos em ambiente controlado de temperatura e fotoperíodo (A). Plantas de alface cv. trocadero sadias na presença de planta infectada com LeMoV e afídeos da espécie *A. Gossypii* (B)..... 46

**Figura 5**. Gel de agarose a 1% com reações de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para LeMoV (parcial RdRp), Lmo3/Lmo4. (M) Marcador 1 kb Plus DNA ladder; (1 a 10) Amostras referentes ao teste de transmissão com *A. gossypii*, ensaio I. (11 a 20) Amostras referentes ao teste de transmissão com *A. gossypii*, ensaio II. (+) Controle positivo para LeMoV. (-) Controle negativo. O tamanho do fragmento amplificado para o controle positivo foi de 278 pb..... 53

**Figura 6**. Gel de agarose a 1% com reações de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para LMV, 08894p e 09171m. (M) Marcador 1 kb Plus DNA ladder; (1 a 4) Quatro amostras positivas para LMV referentes ao teste de transmissão com *A. gossypii* e *M. persicae*, ensaio I e II, respectivamente. (-) Controle negativo. O tamanho do fragmento amplificado foi de 300 pb..... 54

**Figura 7.** Posição dos 17 pares de oligonucleotídeos e dos GSPs (Race 1, 2 e 7) eficientes no sequenciamento do genoma do LeMoV..... 54

**Figura 8**. Domínios putativos conservados detectados na sequência parcial da poliproteína do LeMoV, obtidos através da análise com o BLAST- Basic Local Aligment Search Tool, domínio da CP (azul claro), domínio na helicase, o P-loop

(azul marinho) e domínio da polimerase, a GDD (verde)..... 55
**Figura 9**. Árvore filogenética gerada para a sequência de nucleotídeos da Região da Pro-Pol, do isolado de LeMoV comparados com outras espécies da Família *Secoviridae*. A árvore foi construída pela método neighbour-joining com o programa MEGA 7.0 Bootstrap (2,000 replicatas)..... 57
**Figura 10**. Árvore filogenética gerada para a sequência parcial de nucleotídeos da polimerase para isolados brasileiros e um isolado chileno de LeMoV, comparados com outras espécies pertencentes ao gênero *Sequivirus*. A árvore foi construída pela método neighbour-joining com o programa MEGA 7.0 Bootstrap (2,000 replicatas)..... 59

**CAPÍTULO 2**

**Figura 1**. Plantas de jasmim estrelado coletadas na ilha de Oahu, Honolulu, Hawaii, Estados Unidos..... 71
**Figura 2**. Gel de agarose a 1% com reação de overlap-extension PCR. (M) Marcador Molecular – 100 bp DNA ladder. (1 e 2) "Smear" do produto da reação de overlap-extension PCR, amostras provenientes de folhas de jasmim estrelado submetidas a extração dsRNA e síntese cDNA..... 78
**Figura 3**. Gel de agarose a 1% com vetor pGem-T Easy + Fragmento cDNA clonado a partir da amplificação da amostra proveniente de jasmim estrelado, produto da reação de overlap-extension PCR, síntese de cDNA a partir de dsRNA. (M) Marcador Molecular – 100 bp DNA ladder. (1 a 18) pGEM-T easy + Fragmento cDNA clonado..... 78
**Tabela 1.** Sequências dos treze oligonucleotídeos obtidos a partir das "contigs", para amplificação de regiões da CP e da RdRp..... 74
**Tabela 2.** Período, número de amostras e localidade de plantas de jasmim estrelado sintomáticas coletadas em fevereiro de 2015..... 75
**Tabela 3.** Porcentagem de similaridade dos fragmentos amplificados, clonadas e sequenciados..... 80

## 1. RESUMO

A alface pode ser infectada por diferentes tipos de vírus. O *Lettuce mosaic virus*- LMV foi por muitos anos considerado um dos mais frequentes e amplamente distribuídos mundialmente, podendo ocorrer em infecções simples e/ou mistas com Lettuce mottle virus, LeMoV, um provável sequivirus. A falta de informações a respeito dos aspectos biológicos e moleculares relacionados à classificação taxonômica e à transmissão do LeMoV, motivou a testar sua transmissão com afídeos e por sementes, avançar no sequenciamento do genoma viral e avaliar a incidência do vírus em importantes áreas produtoras de alface no estado de São Paulo. Em 2014, dentre um total de 118 plantas sintomáticas analisadas, 63 (53%) foram positivas para a presença de tospovírus, 11 (9%) foram positivas para LMV e, apenas 6 amostras (5%) foram positivas para LeMoV. Em 2015, 40 plantas (80%) estavam infectadas com tospovírus, e o LMV e LeMoV não foram detectados, indicando que o LeMoV não está limitando a produção de alface, pelo menos não durante o ano de 2014 e 2015. A transmissão desse vírus por sementes não foi verificada nas 832 sementes provenientes de plantas de alface infectadas com LeMoV, o que indica que este vírus provavelmente não seja transmitido por semente. *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* não foram capazes de transmitir o LeMoV de uma planta de alface para outra. Quase toda a sequencia completa do genoma do LeMoV foi obtida e a

presença de domínios conservados verificados na região da capa proteica (CP), da helicase (HEL) e da RNA- dependente de RNA polimerase (RdRp), indicando que o LeMoV é membro da família *Secoviridae* e está estreitamente relacionado com membros do gênero *Sequivirus*. Durante o período do doutorado sanduíche na Universidade do Hawaii em Manoa, plantas de jasmim estrelado, coletadas no Hawaii, exibindo sintomas foliares característicos aos provocados pelos vírus, foram analisadas por sequenciamento de nova geração (SNG), a fim de identificar os patógenos relacionados com a doença. Sequencias relacionadas aos vírus da família *Tombusviridae* como o *Rosa rugosa leaf distortion virus*, *Pelargonium ringspot virus*, *Pelargonium chlorotic ring pattern virus* e *Elderberry latent virus* foram identificados nas plantas de jasmim estrelado, indicando infecção mista por diferentes vírus.

---

Palavras-chave: Sequivirus, *Secoviridae*, *Tombusviridae*, deep sequencing.

**BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Lettuce mottle virus (LeMoV) IN LETTUCE AND NEXT GENERATION SEQUENCING OF VIRUSES FROM STAR JASMINE.**

Botucatu, 2016. 95 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MILENA LEITE DE OLIVEIRA

Adviser: RENATE KRAUSE SAKATE

## 2. SUMMARY

The lettuce plants can be infected by different viruses and the *Lettuce mosaic virus*- LMV was considered for many years one of the most frequent widely distributed in the world and found in simple and mixed infection with Lettuce mottle virus, LeMoV, a probably sequivirus. A lack of information about the biological and molecular aspects related to LeMoV taxonomic classification and transmission, led us to test the transmission of LeMoV by aphids and seeds, to progress the viral genome sequencing and to evaluate the incidence of LeMoV in important producing areas of Sao Paulo State. In 2014, from a total of 118 symptomatic plants analyzed, 63 (53%) were infected by tospoviruses, 11 (9%) were positives for LMV and just 6 (5%)

were positive for LeMoV. In 2015, 40 samples (80%) were infected with tospoviruses, and LMV and LeMoV were not detected, indicating that LeMoV is not limiting the producting of lettuce at least during 2014 and 2015. No seed transmission of LeMoV was verified for a total of 832 seeds obtained from LeMoV infected lettuce plants, indicating that LeMoV is probably not seed transmitted. *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* were also no able to transmit LeMoV from lettuce to lettuce plants. Almost all the complete genome sequence was obtained for LeMoV and the presence of conserved domains verified in the region of the capsid protein (CP), helicase (HEL) and RNA- dependent RNA polymerase (RdRp), may indicate that LeMoV is a member of the family *Secoviridae* and closely related to members of the genus *Sequivirus*. During the doctoral sandwich period in the University of Hawaii at Manoa, star jasmine plants, collected in Hawaii, showing a diverse array of virus-like foliar symptoms, were analyzed by next generation sequencing (NGS) in order to identify the pathogens related with the disease. Sequences related to viruses of the family *Tombusviridae* as *Rosa rugosa leaf distortion virus*, *Pelargonium ringspot virus*, *Pelargonium chlorotic ring pattern virus*, and *Elderberry latent virus* were identified in star jasmine plants indicating mixed infection of different viruses.

---

Keywords: *Sequivirus*, *Secoviridae*, *Tombusviridae*, deep sequencing.

## 3. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta anual, originária de clima temperado, pertencente à família Asteraceae, que provavelmente está entre as hortaliças mais populares e consumidas no Brasil e no mundo (HENZ et al., 2009). Entre as doenças que ocorrem na cultura, destacam-se as de natureza virótica, transmitidas por vetores, podendo ou não serem transmitidas por sementes. Devido a perda da qualidade e a queda na produção, as doenças da parte aérea são intoleráveis, pois afetam diretamente o produto comercial.

No Brasil os principais vírus que causam danos econômicos em áreas produtoras de alface são *Groundnut ring spot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) espécies do gênero *Tospovirus* (COLARICCIO et al., 2003) e o *Lettuce mosaic virus* (LMV) encontrado em praticamente todas as regiões produtoras do mundo, dada sua característica de ser transmitido pela semente (KRAUSE-SAKATE et al., 2002; KRAUSE-SAKATE et al., 2008). Outro vírus encontrado na cultura, mas de menor importância econômica é o Lettuce mottle virus, LeMoV, provável sequivirus, este detectado em infecções mistas com LMV (De MARCHI et al., 2012).

De acordo com levantamento realizado no estado de São Paulo, o LeMoV possui baixa incidência no campo, dentre 1362 amostras de alface com sintomas

de mosaico, apenas 137, ou seja 10.05% estavam positivas para o vírus no ano (KRAUSE-SAKATE et al., 2008). Considerado espécie tentativa do gênero *Sequivirus*, o LeMoV já foi relatado no Brasil por Marinho et al. (1982) e no Chile por Krause-Sakate e colaboradores (2005). Testes biológicos e moleculares, tais como gama de hospedeiro, testes de transmissão e obtenção de oligonucleotídeos específicos foram previamente realizados (MARINHO et al., 1982; JADÃO et al., 2007). No entanto, desde de 2008, não houve avanço nos estudos relacionados aos aspectos epidemiológicos do LeMoV.

Avanços na pesquisa exigem novas técnicas, ou seja, novas metodologias que facilitem o desenvolvimento e o alcance dos objetivos desejados. Com isso, novas tecnologias de sequenciamento vem sendo utilizadas e estão atualmente disponíveis no mercado. O Sequenciamento de Nova Geração (SNG) é uma metodologia inovadora, que possibilita gerar milhões de pares de bases de uma única vez, de modo rápido e eficaz, sem requerer de prévio conhecimento do patógeno, auxiliando na descoberta de novos vírus (ADAMS et al., 2009; MARDIS, 2008; RADFORD et al., 2012).

Na ilha de Oahu, Honolulu, Hawaii, muitas plantas de jasmim estrelado (*Jasminum multiflorum*), tem exibido uma diversidade de sintomas foliares característicos aos provocados por vírus, tais como manchas anelares, linhas cloróticas, mosaico, mosqueado e deformação foliar, todos esses sintomas em uma mesma planta, contudo nada se sabe a respeito de sua etiologia.

Com isso, o objetivo geral do trabalho foi fornecer maior subsídio a respeito dos aspectos epidemiológico do LeMoV e aprimorar o conhecimento na área de sequenciamento, aplicando a nova tecnologia, SNG, a novos patógenos virais provenientes de plantas sintomáticas de jasmim estrelado coletados na ilha de Oahu em Honolulu, Hawaii. Os objetivos específicos foram: (a) realizar testes biológicos com o LeMoV visando compreender como o vírus vem se mantendo presente nas regiões produtoras de alface através dos testes de transmissão por sementes e afídeos, (b) avançar no sequenciamento do genoma do LeMoV com a utilização de ferramentas moleculares, (c) preparar amostras para o SNG por meio da extração dupla fita de RNA, síntese de cDNA e preparo das bibliotecas genômicas. O trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro intitulado “Caracterização Biológica e Molecular do Lettuce mottle virus (LeMoV) em alface” e o segundo intitulado “Sequenciamento de Nova Geração de vírus em Jasmim estrelado”.

# 4. REVISÃO DE LITERATURA

## 4.1 Aspectos gerais da cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) está dentre as hortaliças mais populares e consumidas entre os brasileiros. A popular folhosa pertence a família Asteraceae, considerada uma das maiores famílias botânicas, em torno de 25.000 espécies vegetais (FUNK, 2009). É uma planta anual, originária de clima temperado (HENZ et al., 2009). Domesticada na Europa, região do Mediterrâneo, foi introduzida no Brasil em 1650, pelos portugueses (GOTO, 1998).

O consumo da alface apresenta alguns benefícios à saúde atribuídos a presença de vitamina C, componentes fenólicos e teor de fibra (MULABAGAL et al., 2010). Dentre as variedades comerciais, há variabilidade quanto às características, podem ser lisas ou crespas e formar ou não cabeça "repolhuda" (FILGUEIRA, 2008; MEDEIROS et al., 2007).

Dentre os sistemas de produção da cultura estão: o sistema de produção convencional, o orgânico em campo aberto, o protegido hidropônico e o protegido no solo. Normalmente, cultivada em campo aberto por pequenos agricultores, no entanto, nos últimos anos observou-se um crescimento significativo na produção e no

consumo da alface produzida por meio do plantio hidropônico, tecnologia que permite o cultivo e a oferta de produto de boa qualidade em todas as estações do ano (LOPES et al., 2010).

Cerca de 30 mil hectares de alface são anualmente cultivadas no Brasil (LOPES et al., 2010). A região Sudeste possui a maior produção, sendo o Estado de São Paulo um dos maiores produtores, apresentando uma área cultivada de 9.099,04 ha e produção de 110.035,11 toneladas no ano de 2013, movimentando cerca de R$160.321.171,72 (Instituto de Economia Agrícola, 2014). O CEAGESP-SP comercializou 52.408 toneladas de alface no ano de 2013, desse montante, 23.296 toneladas corresponderam ao grupo de folhas crespas (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA – AGRIANUAL, 2014).

### 4.1.1 Viroses em Alface

#### 4.1.1.1 Vira-cabeça - Gênero *Tospovirus*

Desde de 1986, severas perdas ocasionadas por tospovirus tem sido relatadas na cultura da alface pela presença do TSWV, TCSV e GRSV (COLARICCIO et al., 2001; CHAVES et al., 2001). De acordo com Moraes e colaboradores (1986), os tospovirus são capazes de ocasionar perdas de 30 a 100% em condições de campo, durante o verão brasileiro, de dezembro a março.

Os sintomas ocasionado pelos tospovirus são: lesões necróticas em folhas jovens e pecíolo, variando de marrom claro a negro, as folhas mais velhas exibem manchas cloróticas, os quais se tornam necróticas com o avanço da doença. Posteriormente, as manchas se extendem nas folhas da "cabeça" e o crescimento cessa de um lado, exibindo o sintoma típico da doença, vira-cabeça (MORENO; FERERES, 2012).

O gênero *Tospovirus* pertence a família *Bunyaviridae*, considerado o único gênero da família capaz de infectar plantas. O genoma viral dos tospovirus é tripartido, composto por ssRNA, sendo um segmento com polaridade negativa e os outros dois ambisenso. O RNA L ("large"), senso negativo, possui 8.9 kb, o RNA M ("medium) tem 4.8 kb e o RNA S ("small") apresenta 2.9 kb, totalizando cerca de 16.6 kb (KORMELINK et al., 1992).

O RNA S possui duas fases abertas de leitura (ORFs ambisenso) responsáveis por codificar uma proteína não estrutural (gene NSs) e a proteína do nucleocapsídeo (gene N). Enquanto que o RNA M também contêm duas ORFs (ambisenso), porém essas são capazes de codificar a proteína de movimento (NSm) e um precursor das glicoproteínas (G1/G2), já o RNA L apresenta uma única ORF (senso negativo) que codifica a polimerase viral (gene L) (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

O *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) é considerado a espécie tipo do gênero (FAUQUET et al., 2005), sendo relatado pela primeira vez na Austrália em 1915 (ADKINS et al., 2005). Apresenta ampla gama de hospedeiro, sendo mais de 1000 espécies diferentes de plantas, incluindo plantas cultivadas como o pimentão, alface, fumo, tomate e ornamentais (ROTENBERG et al., 2015; LOPES et al., 2010), bem como plantas daninhas comumente encontradas nos campos de produção da alface (JORDA et al., 1995; CHO et al., 1987).

Os tospovírus são transmitidos por meio de insetos vetores pertencentes à ordem *Thysanoptera*, comumente conhecidos como tripes (MATTHEUS, 1991). No caso das alfaces as espécies transmissoras mais importantes pertencem ao gênero *Frankliniella* (GERMAN et al., 1992), em especial *F. occidentalis* e *F. shultzei*, que transmitem o vírus de maneira circulativa-propagativa (LOPES et al., 2010).

#### 4.1.1.2 *Lettuce mosaic virus* (LMV) - Gênero *Potyvirus*

O LMV foi descrito, primeiramente na Flórida por Jagger (1921) e no Brasil, foi relatado por Kramer et al. (1945). Dentre os vírus da alface, o LMV é considerado o mais comum (LOPES et al., 2010). Os sintomas comumente ocasionados em alface são: mosaico, mosqueado, distorções foliares e redução do crescimento da planta (PAVAN et al., 2008). Os sintomas podem ser variáveis e dependem da interação isolado/planta hospedeira, que causa desde simples mosaico, clareamento das nervuras e até necrose foliar (CANDRESSE et al., 2007).

Este vírus é classificado no gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, o qual apresentam partícula flexuosa, filamentosa, de 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro, com simetria helicoidal (ADAMS et al., 2011). O genoma viral é constituído por uma fita simples de RNA (ssRNA), senso positiva, com cerca de 10.080 nucleotídeos (nt), o qual codifica uma única Open Reading Frame (ORF), uma poliproteína

com 3.255 aminoácidos (aa) (REVERS et al. 1997). Essa poliproteína, após processos de clivagem gera 10 proteínas maduras e uma proteína localizada na região N-terminal da proteína P3, denominada PIPO (ADAMS et al., 2011; CHUNG et al., 2008). A extremidade 5' é covalentemente ligada a uma proteína de origem viral, denominada de VPg, e o terminal 3' do genoma é poliadenilado (ADAMS et al., 2011).

Os isolados de LMV apresentam uma grande variabilidade biológica, podem ser classificados em dois grandes grupos denominados de LMV-Common, que reúne os isolados que infectam cultivares de alface suscetíveis, e o grupo LMV-Most, que engloba os isolados capazes de contornar os alelos recessivos *mol*$^{1}$ e *mol*$^{2}$ (KRAUSE-SAKATE et al., 2002). Até o momento não existem variedades resistentes ou tolerantes aos LMV-Most (PAVAN et al., 2008). No Brasil, a utilização de variedades com o gene recessivo *mol*$^{1}$ tem se tornado uma prática consolidada pelos produtores no Estado de São Paulo, devido a sua eficiência no controle do LMV-Common que é predominante nas condições brasileiras (FIRMINO et al., 2008).

Tal como ocorre com outros potyvirus, o LMV é transmitido eficientemente por muitas espécies de afídeos de maneira não persistente (TOMLINSON, 1970). *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* são considerados os vetores mais eficientes em todo mundo. No Brasil, o LMV tem como principais vetores *M. persicae*, *M. euphorbiae* e *A. gossypii* (LOPES, 2010).

Além disso, isolados de LMV são transmitidos por sementes infectadas, provavelmente o principal fator de dispersão do patógeno (BROADBENT et al., 1951). Devido a esse fato, epidemias podem tomar grandes proporções, o que acarreta perdas significativas, com cerca de 80-100% na cultura da alface (DINANT; LOT, 1992).

Entre as medidas de controle do LMV podem ser citadas a utilização de sementes certificadas (livre de vírus), manter baixa a população de insetos vetores, eliminar hospedeiras alternativas, que servem de fonte de inóculo (PAVAN et al., 2008; LOPES et al., 2010) e utilizar cultivares tolerantes, portadoras dos genes recessivos de resistência, *mol*$^{1}$ e *mol*$^{2}$. Essa resistência é conferida pela presença de mutações nos alelos responsáveis pela codificação do fator de tradução eIF4E da alface (GERMAN-RETANA et al., 2008).

#### 4.1.1.3 Lettuce mottle virus (LeMoV) - Gênero *Sequivirus*

Inicialmente, foi denominado de mosaico necrótico da alface, devido ao sintoma de mosaico associado à necrose em algumas cultivares (KITAJIMA et al., 1980). Foi relatado por Marinho et al. (1982) no Distrito Federal, infectando tanto cultivares suscetíveis, como portadoras dos genes de resistência ao LMV. Em 1986, o LeMoV foi chamado de mosqueado da alface, assim comumente conhecido até o presente momento (MARINHO et al., 1986).

Os sintomas de mosqueado e mosaico ocasionados pelo LeMoV são difíceis de serem distinguidos do LMV (MARINHO; KITAJIMA, 1986). Considerado uma espécie "tentativa", o LeMoV pertence, possivelmente ao gênero *Sequivirus* (Família *Secoviridae*) (STANGARLIN, 2000; JADÃO, 2004), o qual caracteriza-se por possuir vírus de partículas isométricas, não envelopadas com aproximadamente 30 nm de diâmetro. O genoma viral dos sequivirus é composto por uma única fita de RNA sentido positivo de 9-12kb de comprimento. Somente uma ORF codifica uma única poliproteína que pode apresentar a VPg ligada a extremidade 5', visto que a sua presença ainda não foi confirmada (TURNBULL-ROSS et al, 1992; TURNBULL-ROSS et al, 1993, SANFAÇON et al., 2011). De acordo com os sítios de clivagem previstos no International Committee Taxonomy of Viruses (ICTV) (2011), um total de cerca de 7 a 8 proteínas são originadas: P1, CP1, CP2, CP3, Hel, VPg, Pro, RdRp (Figura 1).

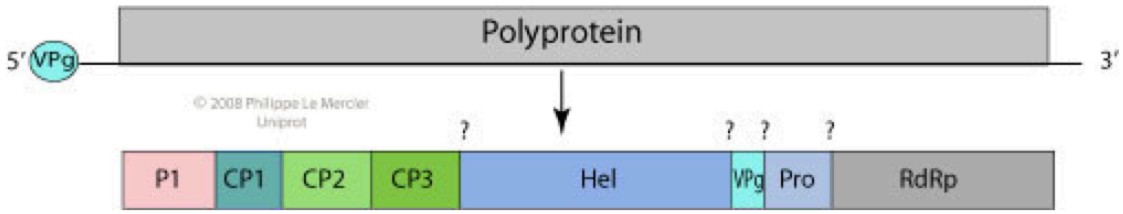



**Figura 1**. Organização genômica do gênero *Sequivirus* (Fonte: ViralZone, 2016)

O gênero *Sequivirus*, pertencente à família *Secoviridae*, possui somente três espécies: *Carrot necrotic dieback virus* (CNDV), *Dandelion yellow mosaic virus* (DaYMV) e *Parsnip yellows fleck virus* (PYFV) (SANFAÇON et al., 2011). Em relação a transmissão do LeMoV, esta foi observada até o momento somente com a espécie *Hyperomyzus lactucae* L. (MARINHO; KITAJIMA, 1986), porém esta espécie de afídeo

não predomina nos campos de produção de alface do Estado de São Paulo, sendo *A. gossypii*, *A. fabae* e *M. persicae* os predominantes (CHAVES, 2006).

De acordo com critérios de demarcação de espécies estabelecidos pelo ICTV, os vírus pertencentes a família *Secoviridae* são considerados de espécies diferentes quando apresentam valores inferiores a 75% de identidade com a sequência de aminoácidos da CP, ou menos de 80% de identidade com sequência de aminoácidos provenientes da região conservada Pro-Pol (SANFAÇON et al., 2011).

Jadão e colaboradores (2007) sequenciaram parcialmente o genoma do LeMoV, o que possibilitou a obtenção de oligonucleotídeos específicos para sua detecção por RT-PCR.

### 4.1.2 Características e Critérios Taxonômicos da Família *Secoviridae* (Ordem Picornavirales).

A família *Secoviridae* pertence a ordem *Picornavirales*, juntamente com mais 4 famílias: *Dicistroviridae, Iflaviridae*, *Marnavirida* e *Picornaviridae,* e mais dois gêneros sem família definida, o gênero *Bacillarnavirus* e o *Labyrnavirus.* Essa ordem inclui vírus capazes de infectar diferentes tipos de hospedeiros, artrópodes em geral (*Dicistroviridae*), apenas insetos (*Iflaviridae*), algas (*Marnaviridae*), vertebrados (*Picornaviridae*) e plantas (*Secoviridae*) (SANFAÇON et al., 2011; LE GAL et al., 2008).

A criação da ordem *Picornavirales* tem sido bastante útil para a classificação taxonômica desse grande grupo de vírus, previamente referidos como “picorna-like viruses” ou “membros da superfamília ou supergrupo picornavirus-like” (LE GALL et al., 2008).

A ordem Picornavirales, inclui alguns vírus de plantas que possuem características muito semelhantes aos vírus que infectam animais, inclusive humanos, classificados na família *Picornaviridae* (ARGOS et al., 1984), tais características incluem: (1) RNA senso positivo, geralmente com VPg ligado a extremidade 5’ e poliadenilado na extremidade 3’, (2) a tradução do genoma em poliproteína com atividade auto-proteolítica, (3) proteína capsidial organizada em um módulo contendo três domínios jerry-roll, o qual formam pequena partícula icosaédrica (pseudo T= 3), não envelopada com cerca de 25-30 nm de diâmetro e (4) um módulo de três domínios contendo a superfamília Helicase III (Le GALL et al, 2008). Os picornavirales compartilham semelhanças nas sequências dos

domínios que codificam NTPase e os domínios putativos da helicase (Hel), proteinase (Pro) e polimerase (Pol), esses organizados na mesma ordem, Hel- (VPg)-Pro-Pol, ao longo da poliproteina (ARGOS et al., 1984).

A relação de parentesco entre os *Picornavirales* é determinada através de análises da região Pro-Pol, delineada pelo motivo "CG" da 3C-like proteinase e o motivo GDD da polimerase, e para delimitar essa região, não é necessário a identificação dos locais de clivagem da proteinase (SANFAÇON et al., 2011) (Figura 2).

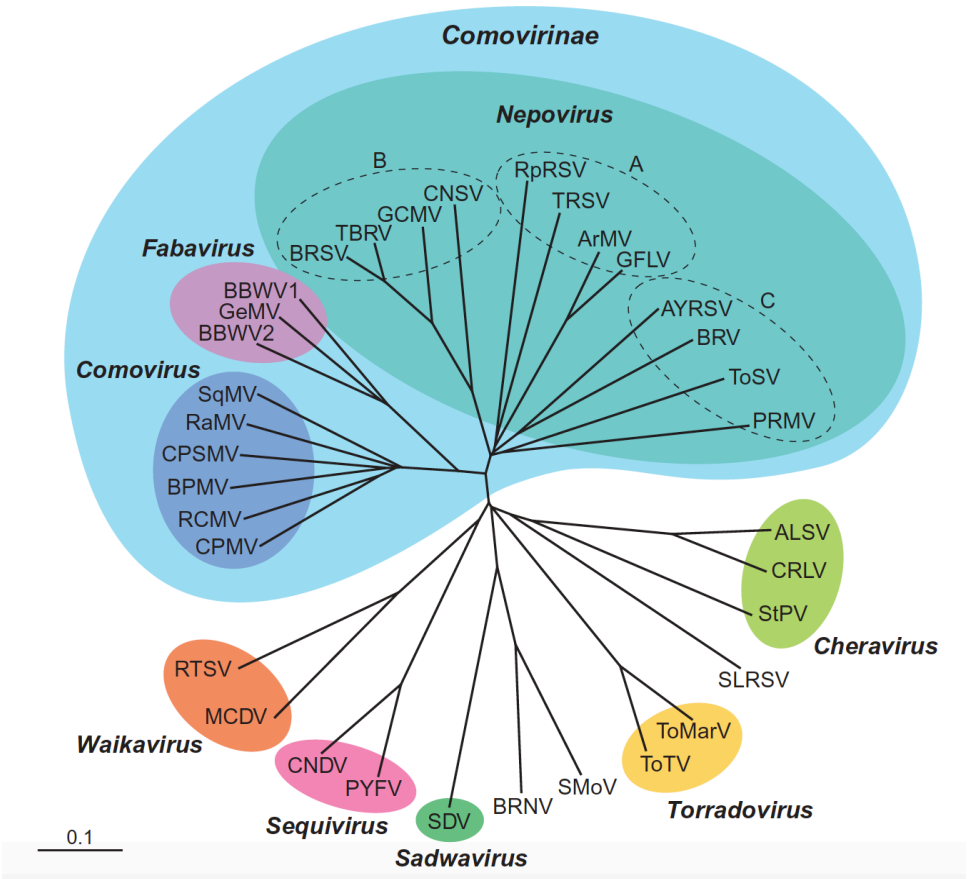



**Figura 2**. Árvore filogenética de membros da família *Secoviridae* baseada na sequencia de aminoácidos com domínios conservados, entre o motivo "CG" da 3C-like proteinase e o motivo GDD da polimerase (região Pro-Pol) (Fonte: SANFAÇON et al., 2011).

A família *Secoviridae* é composta de oito gêneros de vírus, *Comovirus*, *Fabavirus*, *Nepovirus* (subfamília *Comovirinae*), *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Torradovirus*, *Sequivirus* e *Waikavirus,* sendo todos os membros, gêneros que infectam plantas (Figura 2) (SANFAÇON et al., 2011). Alguns vírus de plantas apresentam genoma

bipartido, enquanto que os vírus que infectam animais são monopartidos (LE GALL et al., 2005). Outra característica que os diferem dos vírus de animais é a composição do capsídeo, podendo esse ser composto por uma única proteína capsidial (CP) de 52-60 kDa (*Nepovirus*) ou duas pequenas Cps de 40-45 kDa (*Comovirus*, *Fabavirus* e *Sadwavirus*), ou ainda três CPs de tamanhos similares, 24-35 kDa, 20-26 kDa e 20-25 kDa (*Cheravirus*, *Torradovirus*, *Sequivirus* e *Waikavirus*) (SANFAÇON et al., 2011).

Os picornavirus são tipicamente poliadenilados na extremidade 3', a única exceção é o gênero *Sequivirus* (família Secoviridae), espécie tipo *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) (TURNBULL-ROSS et al., 1993), em contraste outro membro do gênero, o *Carrot necrotic dieback virus* é poliadenilado (SANFAÇON et al., 2011).

### 4.1.3 Domínios Conservados – Família *Secoviridae* (Ordem *Picornavirales*)

Domínios conservados contêm sequencias padrões ou motivos conservados, o qual permitem a sua detecção em sequências polipeptídicas. Na evolução molecular, cada domínio pode ter sido utilizado como componente essencial e recombinados em diferentes arranjos, o qual modelam a função proteica (MARCHLER-BAUER et al., 2015).

Os oito grupos que pertencem a ordem *Picornavirales* podem ser caracterizados por apresentar domínios característicos na helicase (Hel), na VPg, na Proteinase (Pro) e na polimerase (Pol) (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2015).

Na helicase, três são os motivos encontrados: motivo "A" (GxxGxGK(S/T)), em seguida, após 40 aminoacidos, o motivo "B" (DD), acompanhado, após 30 aminoacidos, pelo motivo "C" (KGxxxxSxxxxx(S/T)(S/T)N), sendo esses domínios conhecidos por domínio helicase III da superfamília (GORBALENYA et al., 1990). O motivo A ou Walker A da helicase, também denominado "Walker loop ou P-loop" (phosphate-binding loop), está associada a ligação fosfato, no qual possui um motivo conservado padrão (GXXXXGK[S/T]), onde G, K, T e S indica a presença de uma glicina, lisina, treonina e serina, respectivamente, e o "X" simboliza um aminoácido qualquer. O motivo Walker A é uma sequencia de proteína, conhecida por possuir estruturas tridimensionais altamente conservadas (WALKER et al., 1982).

Na polimerase I, oito são os domínios encontrados, sendo o motivo I (KxE), o motivo V (PSGxxxTxxxN(S/T)) e o motivo VI (YGDD) os mais conservados (HANSEN et al., 1997; BAKER; SCHROEDER, 2008).

Em relação às subunidades do capsídio, estas também apresentam domínios denominados "jelly-roll", constituídos de barril beta. O barril beta é uma grande folha-β que se torce e se enrola formando uma estrutura fechada, onde a primeira fita está ligada a última pelas ligações de hidrogênio, o qual permite o arranjo estrutural da proteína, conferindo estabilidade aos barris beta. Essas folhas-β estão tipicamente arranjadas em forma antiparalela (WIMLEY et al, 2003). Os barris beta podem apresentar topologia "jelly roll" (WIMLEY et al., 2003), motivo estrutural característico da proteína capsidial dos vírus (JONES et al., 1989; CHENG et al., 2013).

Cada subunidade capsidial é composta de três barris beta que pode estar presentes em uma grande CP com três domínios "jelly roll", que é o caso dos *Nepovirus*, ou ainda em duas CPs, sendo uma CP grande com dois domínios e uma CP pequena com apenas um domínio jelly roll, presentes nos *Comovirus*, *Fabavirus* e *Sadwavirus*. Nos gêneros *Cheravirus*, *Torradovirus*, *Sequivirus* e *Waikavirus*, estão presentes três CPs, onde cada uma possui um único domínio jelly-roll (Figura 3) (SANFAÇON et al., 2011).

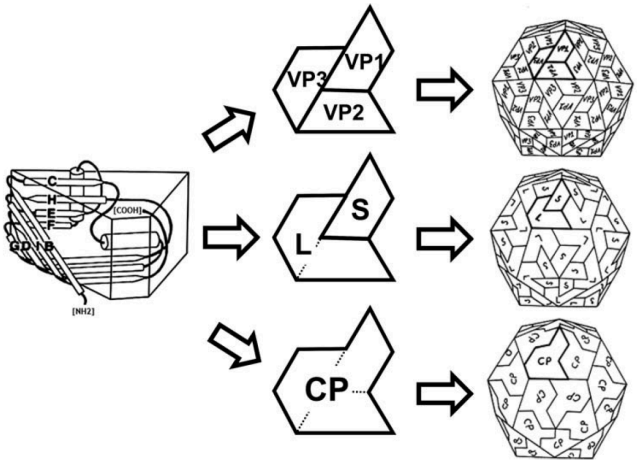



**Figura 3**. Capsídeo (Pseudo-T=3) dos vírus ''picorna-like''. À esquerda, o canônico beta-barril (''jelly-roll''), contendo 8 beta-sheets e duas alpha-hélices; no meio estão os três jelly-rolls, proteoliticamente separados ou não, estando montadas em capsômeros individuais. À direita, seis desses protomeros estão montados formando o capsídeo icosaédrico. No topo, as subunidades da CP (VP1, VP2 e VP3, correspondendo aos domínios CP1, CP2 e CP3, respectivamente) exemplo: *Cheravirus*, *Torradovirus*, *Sequivirus* e *Waikavirus*; no meio duas subunidades da CP (S de "small" e L de "large"), exemplo: *Comovirus*, *Fabavirus* e *Sadwavirus*, e na parte inferior uma unidade única da CP, *Nepovirus*. (Fonte: LE GALL et al., 2008).

A típica topologia “jelly-roll” apresenta algumas variações, de acordo com os diferentes tipos de dobra dos monômeros. A canônica “jelly-roll” barril beta é a forma mais predominante (CHENG et al., 2013). Portanto, as proteínas possuem complexa estrutura geométrica, o qual possuem dobras e rearranjos com diferentes domínios, um deles é a Beta sandwich, que pode apresentar subdivisões em diferentes dobras, por exemplo: 8 cadeias (8-stranded beta sandwich), com topologia jelly-roll, ou ainda 7 e 9 beta-cadeias antiparalelas dispostas em duas folhas-β com uma topologia “Greek-Key”, dentre outros exemplos (CHENG et al., 2013; KISTER et al., 2006).

### 4.1.4 Transmissão de vírus

Transmissão é a transferência de um vírus de material infectado para sadio, o qual pode ocorrer por diferentes meios: material de propagação vegetativa, ferimentos naturais ou provocados por atividades culturais executadas pelo homem (poda, enxertia, dentre outros); sementes, pólen e vetores, tais como insetos, ácaros, nematoides e fungos.

#### 4.1.4.1 Transmissão de vírus por sementes

Na maioria das interações vírus-hospedeiro, a semente pode apresentar efetiva barreira, impedindo a passagem dos vírus, mesmo estes sendo altamente infectivos (DANIELS, 1999). No entanto, apesar da existência dessa barreira, alguns vírus são transmitidos de uma geração a outra via sementes, é o caso do LMV, considerado dentre os vírus transmitidos o mais disseminado no Brasil e no mundo. Pode infectar muitas variedades de alface e provocar severos prejuízos à cultura (DINANT; LOT, 1992).

Mais de 100 espécies de vírus são transmitidos por sementes, apresentando baixa ou alta eficiência. Para alguns vírus a porcentagem de transmissão é de 1-30%, outros possuem cerca de 50%, ou ainda, alguns apresentam 100% de eficiência, dependendo da interação vírus-hospedeiro (AGRIOS, 2005).

A epidemiologia do LMV está associada à taxa de transmissão por sementes, que varia de acordo com o patótipo e a cultivar utilizada (DINANT; LOT, 1992). Segundo Krause-Sakate e colaboradores (2002), a taxa de transmissão do LMV pode variar de 1% a 16% de acordo com a interação dos genótipos da alface com os

isolados LMV-Most ou LMV-Common. Muitos fatores podem influenciar na transmissão de vírus: a espécie ou genótipo da planta hospedeira, o patótipo ou espécie viral, as condições ambientais, a idade da planta mãe, bem como a infecção dos gametas que pode ocorrer antes ou após a fertilização (MAULE; WANG, 1996).

No entanto, mesmo apresentando baixas taxas de transmissão, a porcentagem de plantas infectadas pode ser alta, devido a posterior disseminação do vírus através de afídeos vetores (HULL et al., 2002). No Brasil, perdas totais em campos de alface na presença de populações ativas de afídeos já foram relatadas, mesmo quando a porcentagem de transmissão pelas sementes foi baixa (aprox.. 0,5%) (PAVAN et al., 2005).

Exitem dois tipos de transmissão por sementes, sendo o primeiro externamente, como contaminante e o segundo internamente, onde o vírus é capaz de alojar-se nos tecidos do embrião. Nas sementes de tomate, o *Tomato mosaic virus* (TMV) pode contaminá-las externamente, este tipo de transmissão pode ocorrer com outros tobamoviruses, e a forma de eliminá-los ou inativá-los é via aquecimento (70-76 °C), durante 1 a 3 dias, ou mergulhá-los em solução fosfato trisódio 10%, por 30 minutos. Quando o vírus permanece no interior da semente, ou seja se aloja nos tecidos do embrião, este pode permanecer por meses ou até anos e a única forma de controlá-lo é por meio da colheita de sementes provenientes de plantas sabidamente sadias (HULL, 2002; REZENDE; KITAJIMA, 2011).

A transmissão de vírus por sementes atua como rota de disseminação a longas distâncias e serve como fonte inicial de inóculo para a disseminação por vetores (HAMELIN et al., 2016). Considerada uma fonte primária de infecção na cultura, pode representar um meio eficiente na introdução do patógeno em novas regiões geográficas através do intercâmbio nacional e internacional de sementes (DINANT; LOT, 1992).

#### 4.1.4.2 Transmissão de vírus por vetores

Embora vários sejam os grupos de organismos que desempenham importante papel de vetores de vírus de plantas, os artrópodes são considerados o maior e mais importante, sendo os insetos a grande maioria, tais como afídeos, cochonilhas, moscas brancas, cigarrinhas, coleópteros e tripes que transmitem 76% das 697 espécies

reconhecidas pelo ICTV, sendo os hemípteras responsáveis por 55% desse valor (AGRIOS, 2005; HOGENHOUT et al., 2008; HULL, 2014).

As relações vírus-vetor podem ser classificadas, de acordo com: o local de aquisição e inoculação do vírus na planta; tempo de aquisição e inoculação; período de latência, que consiste no período após a aquisição, necessário para que o inseto se torne capaz de transmitir o vírus; perda do vírus na ecdise; presença do vírus na hemolinfa; capacidade do vírus se replicar no vetor; tempo de retenção do vírus no vetor e a especificidade vírus-vetor. Os principais tipos de relação vírus-vetor são: não-persistente, semi-persistente e persistente (circulativa ou propagativa), que foram derivadas de estudos realizados com vírus transmitidos por afídeos

Os afídeos, dentre os insetos, têm evoluído consideravelmente para serem os exploradores de alimentos mais bem sucedidos em plantas superiores, principalmente em regiões de clima temperado, o que não é surpreendente que eles desenvolvessem como grupo mais importante de transmissão de vírus (HULL, 2002). Segundo Katis et al. (2007), a escolha de uma planta hospedeira pelos afídeos é influenciada por uma variedade de estímulos sensoriais, antes do contato e inserção do estilete na planta. Além disso, há a interação entre o vírus e vetor. Esta pode variar em especificidade e durabilidade, envolvendo a codificação de proteínas estruturais virais essenciais a transmissão na superfície do capsídeo, bem como a codificação pelo vírus de proteínas não-estruturais que auxiliam na aderência da partícula ao local de ligação no vetor; os vírus ligam-se a sítios específicos nos vetores e podem ficar retidos até que sejam transmitidos aos seus hospedeiros (WHITFIELD et al., 2015).

A transmissão de forma **não-persistente** é a mais comum, a qual o vetor realiza a picada de prova que consiste na inserção do estilete nas células da epiderme de uma planta, com objetivo de identificá-la como hospedeira apropriada ou não para colonização, sendo assim, capazes de adquirir o vírus em poucos segundos de alimentação e da mesma maneira transmiti-lo rapidamente, sem período de latência. Na transmissão de maneira **semi-persistente**, a relação vírus-vetor apresenta maior especificidade quando comparada com a não-persistente. A aquisição viral pode ocorrer no parênquima e principalmente no floema. Não há período de latência e o tempo de aquisição é mais prolongado, bem como o período de retenção do vírus, que pode variar de minutos a poucos dias (HOGENHOUT et al., 2008). Das 290 viroses conhecida transmitidas por afídeos a maioria é transmitida de maneira não persistente, sendo as espécies de vírus

pertencentes aos gêneros *Alfamovirus*, *Caulimovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Macluravirus*, e *Potyvirus*, comprovadamente transmitidos de forma não persistente por afídeos (HULL, 2002).

A transmissão de vírus por vetores envolve consideráveis níveis de especificidade e complexidade. Estudos recentes demonstraram que a transmissão do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) por afídeos necessita da interação de três proteínas codificadas pelo vírus: a P2, que interage com o estilete do afídeo ligando o N'terminal ao estilete e o C'terminal se liga ao N'terminal da P3 que está ancorada dentro do capsídio, composto pela proteína P4 (HOH et al., 2010; BLANC et al.,1998). Nos potyvirus, por exemplo, a HC-Pro e a CP, proteínas multifuncionais, são requeridas para a adesão do vírus ao estilete (SHUKLA; WARD, 1988; MAIA et al., 1996). A CP apresenta um motivo conservado DAG, o qual está associado a transmissão por afídeos (LOPES-MOYA et al., 1999). Estudos realizados na região da HC-Pro do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) evidenciaram que os aminoácidos KITC e PTK da HC-Pro se ligam ao motivo DAG da CP, e o motivo KITC se liga ao estilete dos afídeos, na ausência da PTK não ocorre ligação com a CP e consequentemente não há transmissão (PENG et al., 1998; HULL, 2002).

Em relação a transmissão do tipo **persistente**, há circulação do vírus no organismo do vetor, podendo ou não se multiplicar em seus tecidos. Portanto, os vírus transmitidos de forma persistente são conhecidos como circulativos, pois eles percorrem do intestino para a hemocele até atingir as glândulas acessórias, antes de serem inoculados. Alguns vírus são circulativos e se multiplicam em seus vetores, sendo assim chamados de circulativo propagativo. Portanto, a transmissão do tipo persistente pode ser considerada do tipo **circulativo não propagativo**, ou ainda **circulativo propagativo** (HOGENHOUT et al., 2008). Ambos tipos de transmissão, persistente ou circulativa, possuem maior período de aquisição e retenção viral, havendo alta especificidade vírus-vetor. No caso dos vírus que replicam no vetor, ou seja, a transmissão ocorre de forma circulativa propagativa, o período de retenção do vírus ocorre por toda a vida do vetor.

Todos os vírus envelopados são transmitidos de maneira persistente propagativa, incluindo espécies de bunyaviruses e rhabdoviruses, exceto três grupos de vírus não envelopados, reoviruses, tenuiviruses e marafiviruses (HOGENHOUT et al., 2008). Portanto, todos os tospovirus são transmitidos de maneira persistente circulativo propagativo através dos tripes, pequeno inseto pertencente a ordem Thysanoptera

(WHITFIELD et al., 2005; ROTENBERG et al., 2015), onde a larva adquire o vírus, mas apenas o inseto adulto é capaz de transmití-lo (WHITFIELD et al., 2005).

### 4.2 Jasmim estrelado – Família Oleaceae e suas viroses.

Jasmim estrelado (*Jasminum multiflorum*) é uma planta ornamental, pertencente a família Oleaceae, utilizada principalmente na decoração de ambientes e jardins (OGUNDIPE et al., 1998; MAMILLIAN, 1954). É considerada também matéria prima para a produção de perfumes e cosméticos, devido ao aroma característico do seu óleo (BURKILL et al., 1985; HEGNAER, 1982). É uma planta perene, um arbusto com ramos jovens aveludados; suas folhas são simples, ovaladas, opostas e com base arredondada (GANATRA et al., 2013). Oleaceae é uma família cosmopolita, sendo a maioria das espécies nativas do velho mundo, possuindo cerca de 30 gêneros e aproximadamente 600 espécies. No Brasil, algumas espécies de jasmine já foram catalogadas, tais como *J. mesnyi*, *J. polyanthum*, *J. azoricum* (sinônimo *J. fluminense*) e *J. nitidum* (CENTRO DE ESTUDOS AMBIENTAIS E PAISAGÍSTICOS, 2016).

As plantas da família *Oleaceae* podem estar infectadas com vírus, como no estado da Flórida plantas de jasmim estrelado ( *J. multiflorum)* e jasmim ceroso, (*J. gracile)*, apresentaram sintomas virais típicos, incluindo mosqueado, anéis e linhas cloróticas, sendo constatado a infecção por um tobamovirus, *Tomato mosaic virus* (ToMV), sendo o primeiro relato do vírus no Estados Unidos (KAMENOVA; ADKINS, 2006). Outro caso de vírus infectando jasmim é o *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV, gênero *Tospovirus*) em *J. sambac*, planta oleaginosa popular na Indía por suas flores (SUJITHA et al., 2013).

#### 4.2.1 Família *Tombusviridae*

Os tombusvirus estão entre os vírus de plantas de RNA senso positivo mais bem caracterizados (WHITE; NAGI, 2004). O gênero *Tombusvirus* é considerado membro protótipo da família *Tombusviridae*, o qual possui 15 outros gêneros: *Alphacarmovirus*, *Alphanecrovirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Betanecrovirus*, *Betacarmovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Gammacarmovirus*, *Macanavirus*,

*Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Pelarspovirus*, *Umbravirus* e *Zeavirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS, 2015).

*Tomato bushy stunt virus* (TBSV) é a espécie tipo do gênero *Tombuvirus*, apresenta genoma linear, monopartido, molécula de RNA fita simples senso positiva (ssRNA) com cerca de 4.700 nt de comprimento. O genoma dos tombusvirus contêm cinco ORFs codificando proteínas com peso molecular de aproximadamente: 33, 92, 22 e 19 kDa e 41-kDa da capa proteica (RUSSO et al., 1994; WHITE; NAGY, 2004). ORFs 1 e 2 codificam a RNA dependente de RNA polimerase, a ORF3 a capa proteica, a ORF4 a proteína de movimento célula a célula (DALMAY et al.,1993) e a ORF5 pode estar envolvida na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional induzido por vírus (PTGS) (VOINNET et al., 1999).

Na família *Tombusviridae*, havia um grupo de espécies virais que ainda não estavam atribuídas a nenhum gênero (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS, 2011). No entanto, recentemente, novos gêneros foram criados, dentre eles o gênero *Pelarspovirus*, onde algumas das espécies anteriormente sem gênero definido estão classificadas, *Elderberry latent virus* (EILV), *Pelargonium chlorotic ring pattern virus* (PCRPV), *Pelargonium line pattern virus* (PLPV), *Pelargonium ringspot virus* (PRSV) e *Rosa rugosa leaf distortion virus* (RrLDV) (SCHEETS et al., 2015).

Em 2013, Mollov e colaboradores (2013) mostraram que o RrLDV estava mais próximo filogeneticamente do PLPV e PCRPV, apresentando as seguintes organização genômicas (Figura 4): cinco ORFs, sendo a ORF1 responsável pela codificação da proteína 27 kDa (p27), a ORF2 compartilha um códon de iniciação comum a ORF1 e prossegue a leitura até o códon de parada da p27, produzindo a proteína 87 kDa (p87) com sequência de aminoácidos similares a RdRp dos membros da família *Tombusviridae*. A ORF3 codifica uma proteína de 8 kDa sem similaridade significativa com nenhuma sequência viral conhecida. A ORF4 codifica a proteína 6 kDa (p6), o qual possui similaridade com proteínas (p13) de movimento de membros da família *Tombusviridae*. E a ORF5 não apresentou nenhum códon de iniciação, bem como nenhuma sobreposição com a p6 (MOLLOV et al., 2013). Um putativo mecanismo de frame shift +1 permite a tradução da p6 através do códon de parada e resulta na proteína 12 kDa com alta homologia com a proteína p13 dos carmovirus, sendo este, recentemente subdividido em três gêneros, *Alphacarmovirus*, *Betacarmovirus* e *Gammacarmovirus* (KOH et al., 2016). A proteína 37 kDa codificada pela ORF 6 possui similaridade com sequencia de

aminoácidos da capa proteica (CPs) de membros da família *Tombusviridae* (MOLLOV et al., 2013).

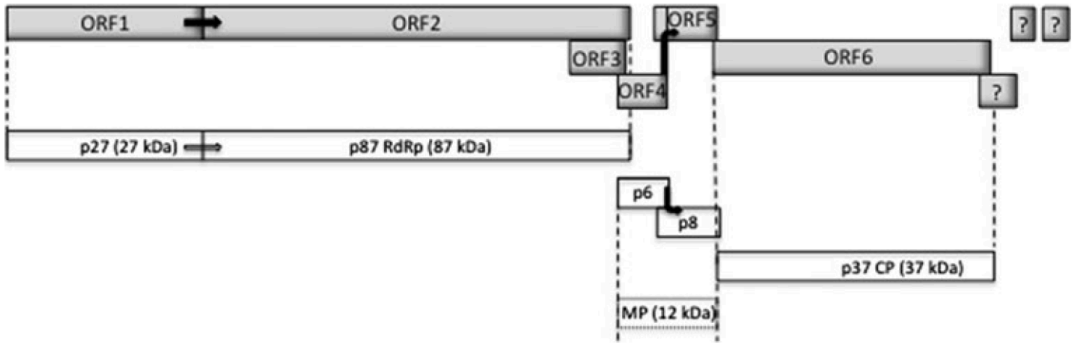



**Figura 4.** Representação esquematica do genoma do RrLDV e a provável estratégia de tradução. ORF 1, 2 e 5 são lidas na fase de leitura, frame 1, ORF 3 e 6 na frame 2 e ORF 4 na frame 3 (Fonte: MOLLOV et al., 2013).

### 4.3 Sequenciamento de Nova Geração aplicado à Virologia Vegetal

Atualmente, diferentes técnicas de detecção e identificação de novos patógenos vem sendo desenvolvidas. Na virologia vegetal, as técnicas de diagnose utilizadas variam bastante de acordo com os indicativos da etiologia viral, tais como testes sorológicos (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) ou moleculares (reação em cadeia da polimerase – PCR, testes de hibridização), bem como análises de microscopia eletrônica ou ainda teste de gama de hospedeiro (ALMEIDA; LIMA, 2001; ALFENAS; MAFIA, 2007).

No sequenciamento de primeira geração, ao amplificar e sequenciar um fragmento do genoma viral, é necessário a amplificação do ácido nucléico pelo método de PCR (MULLIS et al., 1986), seguido do sequenciamento pelo método de Sanger, que utiliza inibidores da síntese em cadeia da polimerase (SANGER et al., 1977).

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de Sequenciamento de Nova Geração (SNG), estão disponíveis no mercado desde 2005 e estão evoluindo rapidamente (CARVALHO; SILVA, 2010). O SNG é uma metodologia que está revolucionando a maneira de sequenciar, alterando o modo de estudar os vírus, atuando particularmente nas áreas de sequenciamento genômico, evolução, ecologia e transcriptomas (RADFORD et al., 2012).

O SNG é capaz de gerar milhões de pares de bases, ou seja milhões de sequencias de DNA de uma única vez, o qual possibilita a realização de projetos que visam o sequenciamento em larga escala de maneira rápida e eficaz (MARDIS, 2008; CARVALHO; SILVA, 2010). O SNG associado com análises de metagenômica são utilizadas na produção de uma grande quantidade de sequencias de cDNA. Este método acelera todo o processo de descoberta de um novo vírus, na identificação, no sequenciamento do genoma viral, e consequentemente, no desenvolvimento de análises para novos patógenos virais (ADAMS et al., 2009).

Dentre as plataformas de sequenciamento disponíveis, podemos citar: 454 FLX da Roche, a Solexa da Illumina, SOLid (Sequencing by Oligonuclotide Ligation and Detection), e Ion Torrent da Life Technologies. O sistema 454 foi a primeira plataforma de sequenciamento de nova geração a ser comercializada. A plataforma 454 realiza o sequenciamento baseado em síntese, o pirosequenciamento (RONAGHI et al.,1998).

Diferentemente dos métodos tradicionais, a técnica de SNG não requerer conhecimento prévio do agente causal da doença, não utiliza nenhum reagente específico para o vírus, como anticorpos, oligonucleotídeos ou sondas (ADAMS et al., 2009). O método consiste na extração do ácido nucleico proveniente de plantas infectadas, na produção de cDNA utilizando primers randômicos e, finalmente, através do sequenciamento, a obtenção de sequencias derivadas de uma grande variedade de possíveis patógenos, tais como fitoplasma, bactérias ou fungos (ADAMS et al., 2009).

Na plataforma Ion Torrent, a técnica se resume basicamente nas seguintes etapas: inicialmente o cDNA é clivado em milhões de fragmentos, os quais são ligados em adaptadores de sequencias conhecidas, posteriormente esses fragmentos são aderidos a pequenas esferas de metais, os quais são adicionados em um chip semicondutor contendo pocinhos, onde as esferas se encaixam, uma por poço. Gradativamente, o chip vai recebendo uma solução contendo os nucleotídeos separadamente, adenina, guanina, citosina e timina. A medida que um nucleotídeos é incorporado a fita, há a liberação de uma molécula de hidrogênio ($H^+$) na solução, essa molécula $H^+$ altera o pH no pocinho, sendo esta mensurada e convertida em voltagem, indicando se o nucleotídeo foi incorporado ou não. Esse processo ocorre simultâneamente em milhões de pocinhos e o processo leva cerca de 3 horas, enquanto que outras metodologias de sequenciamento

podem levar cerca de dias (RADFORD et al., 2012; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2014).

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M.J. et al. Family Potyviridae. In: KING, A.M.K.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier, p. 1069- 1089, 2011.

ADAMS, I. P.; GLOVER, R. H.; MONGER, W. A.; MUMFORD, R.; JACKVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M. e BOONHAM, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. **Molecular Plant Pathology**, v 10, n 4, 537-545. 2009.

ADKINS, S, T. ZITTER, & T. MOMOL. "*Tospoviruses* (Family *Bunyaviridae*, Genus *Tospovirus*)." Univ. of Florida IFAS (Institute of Food & Agricultural Science) fact sheet PP-212, 2005.

AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam. **Elsevier Academic Press**. 2005.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382p.

ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A. de A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja; Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001. p.63-124.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA – AGRIANUAL. Alface. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, p.127. 2014.

ARGOS P, KAMER G, NICKLIN MJ, WIMMER E. Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. **Nucleic Acids Research,** v. 12, p. 7251-7267,

1984.

BAKER, A. C.; SCHROEDER, D. C. The use of RNA- dependent RNA polymerase for taxonomic assignment of Picorna-like viruses (Order Picornavirales) infecting *Apis mellifera* L. populations. **Virology Journal**. V5, 10, 2008.

BLANC, S., AMMAR, E. D., GARCIA-LAMPASONA, S., DOLJA, V.V., LLAVE, C., BAKER, J., PIRONE, T. P. Mutations in the potyvirus helper componente protein:effects on interactions with virions and aphid stylets. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 3119–3122, 1998.

BROADBENT, L., TINSLEY, T. W., BUDDIN, W., and ROBERTS, E. T. The spread of lettuce mosaic in the field. **Annual Applied Biology**, v. 38: 689–706, 1951.

BURKILL H.M., "The Useful Plants of West Tropical Africa", The White Friars Press Ltd, London, 1985,1-30.

CANDRESSE, T.; LOT, H.; GERMAN-RETANA, S., KRAUSE-SAKATE, R.; THOMAS, J.; SOUCHE, S.; DELAUNAY, T.; LANNEAU, M.; LE GALL, O. Analysis oh the serological variability of *Lettuce mosaic virus* using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. **Journal of General Virology***,* Reading, v. 88, p. 2605-2610, 2007.

CARVALHO, M. C. da C. G. ; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735-744, Mar. 2010.

CENTRO DE ESTUDOS AMBIENTAIS E PAISAGÍSTICOS (Minas Gerais) (Ed.). **Oleaceae**. CEAP Design. Disponível em: <http://www.ceapdesign.com.br/familias_botanicas/oleaceae.html>. Acesso em: 25 set. 2016.

CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; MOREIRA, S.R.; CHAGAS, C.M. Detecção do *Groundnut ringspot tospovirus* em alface e tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 50-53, 2001.

CHAVES, A.L.R . Interações do *Lettuce mosaic virus* (LMV) x afídeos vetores nas regiões produtoras de alface (*Lactuca sativa* l.) do cinturão verde de São Paulo, 2006, 130f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, Botucatu, 2006.

CHENG, S.; BROOKS, C. L. Viral Capsid Protein Are Segregated in Strutural Fold Space. **Plos Computational Biology**, v. 09, 2013.

CHO, J. J. et al. Epidemiology of tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 6, p.505-508, 1987.

CHUNG, B. Y.-W., MILLER, A.W., ATKINS, J.F., FIRTH, A.E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **PNAS**, v.105, n.15, p. 5897–5902, 2008.

COLARICCIO, A., CHAVES, A.L.R., EIRAS, M., ROGGERO, P., PALAZZO, S.R.L., COSSA, A.C. Diversidade de fitovírus em asteráceas no cinturão verde de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.1., p.63, 2003.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R.; ROGGERO, P.; CHAGAS, C. M. Diversidade de tospovírus em olericolas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 27, pág. 177-182, 2001.

DALMAY, T., RUBINO, L., BURGYA´ n, J., KOLLA´ r, A. & RUSSO, M. Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome. **Virology**, v. 194: 697–704, 1993.

DANIELS, J. Quando o vírus está na semente. Cultivar hortaliças e frutas. Pelotas/RS. Ano I, n. 5, p.34-35, jun./1999.

DE MARCHI, B.R., SPADOTTI, D.M.A, OLIVEIRA, M.L., SANCHES, M.M., KRAUSE-SAKATE, R., PAVAN, M.A. Levantamento revela a predominância do Lettuce mottle virus em três regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 245-247, 2012.

DINANT, S.; LOT, H. *Lettuce mosaic virus*: A review. **Plant Pathology**, Oxford, v.41, p.529-542, 1992.

FAUQUET, C.M. et al. **Virus Taxonomy, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 8 ed. London: Elsevier/Academic Press, 2005. 1162 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2008. 421p.

FIRMINO, A. C., KRAUSE-SAKATE, R., PAVAN, M.A., SILVA, N., HANAI, S.M., ANBO, R.H., NIETZSCHE, T., Le GALL, O. Prevalence of Lettuce mosaic virus - common strain on three lettuce producing areas from São Paulo State. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.2, p.161-163, 2008.

FUNK, V.A. Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. Vienna: **International Association for Plant Taxonomy**, p.965, 2009.

GANATRA, S. H.; DURGE, S. P.; RAMTEKE, A. M. Phytochemicals investigation and tlc analysis of *Jasminum multiflorum* leaves. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 4, n.3, p.1135-1139, 2013.

GERMAN, T. L.; ULLMAN, D. E.; MOYER, J. W. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. Annual Ver. Phytopathol., v. 30, p.315-348, 1992.

GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J.; LEGALL, O. *Lettuce mosaic virus*: from

pathogen diversity to host interactors. **Molecular Plant Pathology**, v.9, p.127-136, 2008.

GORBALENYA AE, KOONIN EV, WOLF YI. A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNAviruses. **FEBS** Lett, v. 262, p. 145–148, 1990.

GOTO, R. A cultura de alface. In: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. (Org.). Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, cap. 5, p.137-159, 1998.

HAMELIN, F. M.; ALLEN, L. J. S.; PRENDEVILLE, H. R.; HAJIMORAD, M. R.; JEGER, M. J. **The evolution of plant virus transmission pathways**. Journal of Theoretical Biology. v 396, 75–89, 2016.
HANSEN, J. L., A. M. LONG, and S. C. SCHULTZ. "**Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus.**" Structure (Camb.) v. 5, n.8: 1109-22, 1997.

HEGNAER R., "Cultivation and Utilization of Aromatic Plants, Regional Research Laboratory, CSIR, Jammu- Tawi., 1-22, 1982.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de Alface Cultivados no Brasil**. EMBRAPA – Comunicado Técnico. Brasília: DF, 2009.

HOGENHOUT, S. A. et al. Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 327–359, 2008.

HOH, F., UZEST, M., DRUCKER, M., PLISSON-CHASTANG, C., BRON, P., BLANC, S., DUMAS, C. Structural insights into the molecular mechanisms of cauliflower mosaic virus transmission by its insect vector. Journal of Virology, v. 84, p. 4706–4713, 2010.

HULL, R. Matthews Plant Virology. 4 ed. San Diego: Academic Press, 2002. 1001p.

HULL, R. Plant Virology, 5ª edição. Elsevier, NewYork, 2014.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA.Valor da Produção dos principais produtos da agropecuária. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: 20 ago. 2016.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS. ICTV Virus Taxonomy. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20154353>. Acesso em: 18 set. 2016.

JADÃO A.S., PAVAN M.A., KRAUSE-SAKATE, R., ZERBINI, F.M. Efeitos na fotossíntese e área foliar de cultivares de alface inoculadas mecanicamente por patótipos do *Lettuce mosaic virus* (LMV) e Lettuce mottle virus (LeMoV). Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v. 29, p.11-15, 2004.

JADÃO, A. S.; Krause-Sakate, R.; Liberti, D.; Pavan, M. A.; Echer, M. M.; SVANELLA-DUMAS, L.; , ZERBINI, F. M.; CANDRESSE, T. & LE GALL, O. Further characterization of two sequiviruses infecting lettuce and development of specific RT-PCR primers. **Archives of Virology**, Vienna, v. 152, p. 999–1007, 2007.

JAGGER, I.C. A transmissible mosaic disease of lettuce. Journal of Agricultural Research 20, 737-741. 1921.

JONES EY, STUART DI, WALKER NP. Structure of tumour necrosis factor. **Nature,** v. 338: 225–228, 1989.

JORDA, C., ORTEGA, A., and JUAREZ, M. New hosts of tomato spotted wilt virus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79: 538, 1995.

KAMENOVA, I., ADKINS, S. and ACHOR, D. Identification of *Tomato mosaic virus infection* in jasmine. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 722, p. 277-284, 2006. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.722.34. http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.722.34

KATIS, N. I. et al. A **Transmission of Plant Viruses**. In: Aphids as Crop Pests. London: CABI, 2007, cap .14, p. 353-390.

KISTER, A. E.; FOKAS, A. S.; PAPATHEODOROU T. S., GELFAND I. M. Strict rules determine arrangements of strands in sandwich proteins. **PNAs**, v. 103, n. 11, p. 4107-4110, 2006.

KITAJIMA, E.W. et al. Mosaico necrótico da alface - Um vírus isométrico transmitido por afídeos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 5, p. 409, 1980.

KOH, S. H.; ONG, J. W. L.; ADMIRAAL, R.; SIVASITHAMPARAM, K.; JONES, M. G. K.; WYLIE, S. J. A novel member of the *Tombusviridae* from a wild legume, *Gompholobium preissii.* **Archieves of Virology**, Vienna, v. 161, p. 2893–2898, 2016.

KORMELINK, R., DE HAAN, P., MEURS, C., PETERS, D. & GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **Journal of General Virology**, Reading, v. 73, p. 2795-2804, 1992.

KRAUSE-SAKATE, R., LE GALL, O., FAKHFAKH, H., PEYPELUT, M., MARRAKCHI, M., VARVERI, C., PAVAN, M.A., SOUCHE, S., Lot, H., ZERBINI, F.M., CANDRESSE, T.. Molecular characterization of *Lettuce mosaic virus* field isolated reveals a distinct and widespread type of resistance breaking isolate: LMV-Most. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.563-572, 2002.

KRAUSE-SAKATE, R., FIRMINO, A.C., JADÃO, A.S., PAVAN, M.A., da SILVA, N., HANAI, S.M., ANBO, R.H., NIETZSCHE, T. Ocorrência generalizada do Lettuce mottle virus em três regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 88-89, 2008.

KRAMER, M., ORLANDO, A., SILBERSCHMIDT. Estudos sobre uma grave doença de

vírus, responsável pelo depreciamento de nossas culturas de alface. **Biológico**, Campinas, v. 11, p. 121-134, 1945.

LE GALL, O.; IWANAMI, T.; JONES, A.T.; LEHTO, K.; SANFACON, H.; WELLINK, J.; WETZEL, T.; YOSHIKAWA, N. *Cheravirus*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV**. London: Elsevier/Academic Press, 2005, p. 803-805.

LE GALL O, CHRISTIAN P, FAUQUET CM, KING AM, KNOWLES NJ, NAKASHIMA N, STANWAY G, GORBALENYA AE. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single stranded RNA viroses with a pseudo-T = 3 virion architecture. **Archieve of Virology**, Vienna, v. 153, p. 715–727, 2008.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da Alface**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2010. 68 p.

LOPEZ-MOYA J.J., WANG R.Y., PIRONE T.P.. Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. **Journal of General Virology**, Reading, v. 80, p. 3281-3288, 1999.

MAIA, I.G.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology**, Reading, v.77, p.1335-1341. 1996.

MAMILLIAN H.F.; "Tropical Planting and Gardening", Macmillan Co. Ltd. London, 2-20, 1954.

MARCHLER-BAUER A, DERBYSHIRE MK, GONZALES NR, LU S, CHITSAZ F, GEER LY, GEER RC, HE J, GWADZ M, HURWITZ DI, LANCZYCKI CJ, LU F, MARCHLER GH, SONG JS, THANKI N, WANG Z, YAMASHITA RA, ZHANG D, ZHENG C, BRYANT SH. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research** 2015 Jan 28;43 (Database issue):D222-2. doi: 10.1093/nar/gku1221. Epub 2014 Nov 20.

MARDIS, E. R. The impact of next- generation sequencing technology on genetics. **Cell Press**, v. 24, n 3, p. 133-141, 2008.

MARINHO, V.L.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. & COSTA, C.L.. Caracterização do vírus do mosqueado da alface. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.7, n.3, p.543, 1982.

MARINHO VLA, KITAJIMA EW. Virus do mosqueado da alface – um virus isométrico transmitido por afideo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 11, p. 923–936, 1986.

MATTHEWS, R. E. F. Plant Virology. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1991. 835 p.

MAULE, A.J.; WANG, D. Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. **Trends in Microbiology**, v.4, p.153-158, 1996.

MEDEIROS, D. C. ; et al. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 3, 2007.

MOLLOV D., LOCKHART B., ZLESAK D. C. Complete nucleotide sequence of *Rosa rugosa leaf distortion virus*, a new member of the family *Tombusviridae***. Archieves of Virology**, Vienna, v. 158, p. 2617–2620, 2013.

MORAES, G. J.; WANDERLEY, L. J.; COSTA, A .S. Surto de vira-cabeça na cultura de alface em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 6, p.24-25, 1986.

MORENO, A.; FERERES, A. Virus Diseases in Lettuce in the Mediterranean Basin. **Advances in Virus Research**, v. 84: 247-287, 2012.

MULABAGAL, V., NGOUAJIO, M., NAIR, A., ZHANG, Y., GOTTUMUKKALA, A. L., and NAIR, M. G. In vitro evaluation of red and green lettuce (Lactuca sativa) for functional food properties. **Food Chemical**, v. 118, p. 300–306, 2010.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold **Spring Harb Symp Quant Biol,** v. 51, p. 263–273, 1986.

OGUNDIPE O., AKINBIYI O., and MOODY J.O., "Antimicrobial Activities of Selected Ornamental Plants" Nig.J. Nat.Prod. and Med., Vol 2, 1998.

PAVAM, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. In: HIROSHI, K.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (ED). Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Piracicaba: CERES, 2005. V.2, p. 27-33.

PAVAN, M.A., KRAUSE-SAKATE, R., SILVA, N., ZERBINI, F.M., LE GALL, O. Virus Diseases of Lettuce in Brazil, **Plant Viruses**, Isleworth, n.2, v.1, p.35-41, 2008.

PENG, Y. H. et al. Mutations in the HC-Pro gene of Zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. **Journal of General Virology**, Reading, v.79, p.897–904, 1998.

RADFORD, A. D.; CHAPMAN, D.; DIXON, L.; CHANTREY, J.; DARBY, A. C.; HALL, N. Application of next-generation sequencing Technologies in virology. **Journal of General Virology**, Reading, v. 93, p. 1853-1868, 2012.

REVERS, F.; LOT, H.; SOUCHE, S.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; DUNEZ, J. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, p.397- 403, 1997.

REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E.W. Vírus e viróides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, cap. 10, p. 227-254.

RONAGHI, M. et al. **A sequencing method based on real-time pyrophosphate**. Science, v.281, p.363–365, 1998. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/ 281/5375/363>. Acesso em: 29 ago. 2016. doi: 10.1126/ science.281.5375.363.

ROTENBERG, D.; JACOBSON, A. L.; SCHNEWEIS, D. J. e WHITFIELD, A. E. Thrips transmission of tospoviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 15, p. 80–89, 2015.

RUSSO, M., BURGYÁN, J. & MARTELLI, G. P. Molecular biology of *Tombusviridae*. **Advance Virus Research**, v. 44, p. 381–428, 1994.

SANFAÇON, H., GORBALENYA, A.E., KNOWLES, N.J. & CHEN, Y. Picornavirales. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. pp 835-839. San Diego: Elsevier. 2011.

SANGER, F. et al. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proc. Natl. Academic Science, U. S. A. 74, 5463–5467, 1997.

SCHEETS, K.; JORDAN, R.; WHITE, K. A.; HERNÁNDES, C. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. **Archieves of Virology**, Vienna, v. 160, p. 2385–2393, 2015.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. **Journal of General Virology**, Reading, v.69, p.2703-2710, 1988.

STANGARLIN, O., PAVAN, M.A., SILVA, N. Ocurrence of a new pathotype of lettuce mosaic virus on lettuce in Brasil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n.4, p.490, 2000.

SUJITHA, S.; BHASKARA REDDY, B. V.; SIVAPRASAD, Y.; USHA, R.; KRISHNA, T. G.; GOPAL, D. V. R. S. First Report of *Groundnut bud necrosis virus* in jasmine. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 95, n. 3, p. 659-668, 2013.

THERMO FISHER SCIENTIFIC (2014). Ion Torrent $^{TM}$ Next- gen sequencing technology [arquivo de vídeo]. Acesso em: 12 Set., 2016. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbxIfuKs.

TOMLINSON, J. A. Lettuce mosaic virus. In: Comnionwealth Agricultural Bureaux Association of Applied Biologists. Descriptions of plant viruses, n. 9, Kew, 1970.

TURNBULL-ROSS,A.D., READY,B, MAYO,M.A., MURANT,A.F. The nucleotide sequence of Parsnip yellow fleck virus: a plant picorna-like virus. **Journal of General Virology**, Reading, v. 73, p. 3203-3211. 1992.

TURNBULL-ROSS,A.D., MAYO,M.A., MURANT,A.F. Sequence analysis of the *Parsnip yellow fleck virus* polyprotein: evidence of affinities with picornaviruses. **Journal of General Virology,** Reading, v. 74, 555-561. 1993.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; GEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. New York: Academic Press, 2000. 1162p.

VIRALZONE: a knowledge resource to understand virus diversity. Sequivirus. 2015. Disponível em: < http://viralzone.expasy.org/all_by_species/660.html>. Acesso em: 12 jun. 2016.

VOINNET, O., Y. PINTO, and, D. C. BAULCOMBE. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 96, p. 14147–14152, 1999.

WALKER, J. E.; SARASTE M.; RUNSWICK, M. J.; GAY N. J. Distantly related sequences in the α- and β- subunit of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP – requiring enzymes and a common nucleotide biding fold. **The EMBO Journal**, v1. n 8, p. 945-951, 1982.

WHITE KA, NAGY PD. Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. **Prog Nucleic Acids Res Mol Biol**, v. 78, p. 187–226, 2004.

WHITFIELD, A.E., ULLMAN, D.E., GERMAN,T.L. Tospovirus–thrips interactions. **Annual Review Phytopathology**, v. 43, p. 459–489, 2005.

WHITFIELD, A. E., BRYCE, W. F., ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viroses. **Virology**, v. 479-480, p. 278–289, 2015.

WIMLEY, WC. "The versatile beta-barrel membrane protein". **Curr Opin Struct Biol**, v. 13, n. 4, p. 404–11, 2003.

# CAPÍTULO I:

# "CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DO Lettuce mottle virus (LeMoV) EM ALFACE"

**Caracterização Biológica e Molecular do Lettuce mottle virus (LeMoV) em alface**

## 1. RESUMO

As doenças causadas por vírus estão entre os principais problemas fitossanitários da cultura da alface. Dentre os que ocasionam maior perda na produção, estão os vírus pertencentes ao gênero *Tospovirus*, bem como uma espécie do gênero *Potyvirus*, o *Lettuce mosaic virus* (LMV). Outro vírus presente na cultura, no entanto em baixa incidência, é o Lettuce mottle virus (LeMoV), espécie tentativa do gênero *Sequivirus*. Através de RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para as espécies, LMV e LeMoV, e um par de oligonucleotídeos universal para o gênero *Tospovirus*, amostras de alface, preferencialmente com sintomas de mosaico, foram coletadas em regiões produtoras do estado de São Paulo e analisadas para a presença dos vírus. Devido a escassez de dados biológicos e moleculares do LeMoV, testes de transmissão por sementes e com afídeos, *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*, foram realizados, bem como o sequenciamento do genoma parcial através de oligonucleotídeos específicos obtidos nesse trabalho. O levantamento mostrou uma maior incidência de tospovirus nos campos de produção da alface durante os períodos de coleta. Cerca de 8364 nucleotídeos foram sequenciados do LeMoV, incluindo a região da Pro-Pol, utilizada nas

análises filogenéticas. O isolado brasileiro de LeMoV sequenciado nesse trabalho apresentou domínios putativos conservados na região da CP, HEL e RdRp, estando mais próximo filogeneticamente de membros do gênero *Sequivirus*.

Palavras-chave: *Sequivirus*, transmissão, análises filogenéticas.

**Biological and Molecular Characterization of Lettuce mottle virus (LeMoV) in lettuce**

## 2. ABSTRACT

The virus diseases are extremely important for the lettuce crop, being the tospoviruses the most important as well the potyvirus *Lettuce mosaic virus* (LMV). Lettuce mottle virus (LeMoV), a tentative species of genus *Sequivirus,* is also found infecting lettuce . Through the RT-PCR using specific primers for LMV and LeMoV, and one pair of universal primer for genus *Tospovirus*, lettuce sample preferentially with mosaic symptom were collected in producing regions of Sao Paulo State and analized for the presence of these viruses. Due to the lack of biological and molecular data of LeMoV, transmission tests with seeds and aphids, *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*, were performed, as well as the parcial sequencing of the genome using specific primers obtained in this work. Tospoviruses were prevalent during the collection period. About 8364 nucleotides of LeMoV were sequenced, including the Pro-Pol region, used in phylogenetics analyses. The brazilian isolate of LeMoV sequenced in this work showed putative conserved domains on the CP, HEL and RdRp region, being closer phylogenetically to the genus *Sequivirus*.

Keywords: *Sequivirus*, transmission, phylogenetic analyses.

## 3. INTRODUÇÃO

O cultivo da alface é realizado em zonas produtoras próximas às áreas metropolitanas, conhecidas como "cinturão verde", devido a curta vida pós-colheita (HENZ, 2009). Durante todo o ano, a produção olerícola paulista é desenvolvida, concentrada em cidades de médio e grande porte localizadas no interior do estado. Dentre as folhosas, a alface possui a maior área cultivada, e os municípios de Mogi das Cruzes, Ibiúna, Piedade e Biritiba-Mirim são responsáveis por 66% da área estadual de cultivo (CARVALHO et al., 2013).

Entre os problemas fitossanitários da cultura da alface merecem destaque as doenças causadas por vírus, que podem ser transmitidas por diferentes vetores ou por meio de sementes infectadas (HULL, 2002). Dependendo das condições ambientais e das medidas de manejo aplicada a cultura, os vírus podem ser responsáveis por perdas de até 100% (RESENDE; CUPERTINO, 1995).

No Brasil, diversos vírus infectam a cultura da alface e ocasionam danos já foram relatados, dentre eles estão: o *Lettuce mosaic virus*, LMV, considerado um dos mais importantes, encontrado em todas as regiões produtoras de alface no Brasil (KRAUSE-SAKATE et al., 2002), o Lettuce mottle virus, LeMoV, provável sequivirus (JADÃO et al., 2007), este detectado em infecções mistas com o LMV (De MARCHI et

al., 2012), e espécies do gênero *Tospovirus*, *Groundnut ring spot virus* (GRSV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) (COLARICCIO et al., 2003)

No ano de 1995, foi realizado um levantamento em campos de produção comercial de alface no Estado de São Paulo, o qual indicava a presença de um vírus que causava sintomas de mosqueado, o LeMoV (STANGARLIN, 1995). Posteriormente, estudos apontaram que a incidência do LeMoV comparada ao LMV era muito baixa nos anos de 2002 a 2005 (FIRMINO et al., 2008). Em 2007, apesar da baixa incidência, o LeMoV mostrou-se constante no campo, sendo encontrado em todas as regiões avaliadas do Estado de São Paulo (KRAUSE-SAKATE et al., 2008). Entre 2008 a 2010, foi possível detectá-lo em maior incidência que o LMV, possivelmente, devido a uma maior utilização de variedades tolerantes ao LMV (DE MARCHI et al., 2012).

Segundo Marinho et al. (1986), o LeMoV é transmitido por extrato vegetal e pelo afídeo *Hyperomyzus lactuca* L., no entanto, esta é uma espécie de afídeo não predominante nos campos de produção de alface do Estado de São Paulo, sendo *Aphis gossypii*, *Aphis fabae* e *Myzus persicae,* as principais espécies detectadas (CHAVES, 2006). No que refere à transmissão do LeMoV por sementes, esta não foi constatada até o momento (JADÃO et al., 2007). Contudo, não é possível afirmar que os isolados de LeMoV atualmente presentes no campo, apresentam as mesmas características epidemiológicas.

Sendo assim, devido a exiguidade de dados biológicos e moleculares, esse trabalho teve como objetivos: realizar um levantamento dos principais vírus presentes na cultura da alface em regiões produtoras do estado de São Paulo; testar a transmissão do LeMoVcom afídeos e por sementes provenientes de plantas infectadas para melhor compreender sua transmissão no campo; bem como avançar nas análises moleculares, no sequenciamento do genoma viral, a fim de classificá-lo taxonomicamente, visto que este vírus é considerado uma espécie "tentativa" do gênero *Sequivirus*.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1. Coleta de alface e levantamento dos principais vírus (LMV, LeMoV e Tospovírus)

Foram realizadas coletas de alface em regiões produtoras do estado de São Paulo/SP (Tabela 1), como: Campinas, Biritiba Mirim (região de Mogi das Cruzes), Piedade e pequenos produtores na região de Botucatu. O levantamento dos principais vírus teve início em setembro de 2013 a maio de 2015. Cento e oito plantas sintomáticas de alface foram coletadas em Campinas, 40 em Biritiba Mirim, 15 em Botucatu e 5 em Piedade.

As plantas preferencialmente com sintomas típico de mosaico foram coletadas, bem como outros sintomas característicos de vírus, tais como: lesões necróticas, necrose do limbo das folhas mais jovens, e enrolamento foliar, indicando uma possível infecção por tospovirus. As plantas de alface coletadas foram direcionadas ao laboratório de Virologia Vegetal– Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Campus de Botucatu (SP), onde ficaram armazenadas a 4$^{o}$C para posterior análise.

**Tabela 1**. Período, número de amostras e localidade de plantas sintomáticas coletadas durante setembro de 2013 a maio de 2015.

| Coletas | Período de Coletas | Nº de amostras coletadas | Localidade |
|---|---|---|---|
| **1** | Setembro 2013 | 5 | Piedade-SP |
| **2** | Março 2014 | 8 | Botucatu-SP |
| **3** | Abril 2014 | 58 | Campinas-SP |
| **4** | Maio 2014 | 7 | Botucatu-SP |
| **5** | Junho 2014 | 40 | Biritiba Mirim-SP |
| **6** | Maio 2015 | 50 | Campinas-SP |
| **Total** | | **168** | |

### 4.2. Extração de RNA total

Foram utilizadas duas metodologias de extração de RNA total. Na primeira, as amostras foram extraídos pelo método proposto por Bertheau et al. (1998). As folhas das plantas foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2 % (p/v) e Na-DIECA 20 mM, e transferido para um microtubo, no qual foram centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, 200 µl do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde adicionou-se SDS a 1 %, seguido de incubação a 55$^{o}$C por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µl de solução de acetato de potássio 3M, seguindo por agitação da solução. As amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por mais 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foi acrescentado 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de solução aquosa de silício. A solução foi bem agitada e mantida por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a mesma foi submetida a centrifugação por um minuto a 5.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o 'pellet' lavado duas vezes com 500 µl de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto. Após centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm, o 'pellet' foi secado a vácuo e o RNA ressuspendido em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55°C e mais 5 minutos de centrifugação a 13.000 rpm. Na etapa final, 300 µl do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C.

A segunda metodologia utilizada foi com o Kit de extração de RNA total, Total RNA Purification Kit (Norgen). A extração foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante, onde as amostras pesadas, cerca de 0,05 gramas, foram trituradas

em nitrogênio líquido com auxílio de um gral e pistilo. Em seguida, foi adicionado ao macerado 600 µl da solução de lise (Lysis solution) e transferido para microtubos de 1,5 ml. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm, e o sobrenadante transferido para novos tubos. Igual volume de etanol 70% foi adicionado e centrifugado por 1 minuto. Cerca de 600 µl do lisado com etanol foi adicionado em colunas com novos tubos e centrifugado por um minuto, seguido do descarte do líquído que passou, essa operação foi repetida quando necessário. Na etapa seguinte, 400 µl da solução de lavagem (Wash solução) foi adicionado, seguida de centrifugação por 1 minuto. A etapa de lavagem foi realizada três vezes e após descarte, as colunas foram submetidas a centrifugação por 2 minutos, para secagem do filtro. Na etapa final, 50 µl de tampão de eluição (RNA elution buffer) foi adicionado e centrifugado por 2 minutos a 2.000 rpm, seguido de mais 1 minuto a 14.000 rpm, para eluição total do RNA, sendo armazenado a -80°C.

### 4.3. Transcrição reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Uma alíquota de 2,5 µl do RNA total extraído foi utilizada para a síntese de cDNA, a partir da Transcriptase reversa e a Reação em Cadeia da Polimerase em uma só etapa (RT-PCR), juntamente com 12,5 µL de PCR Master Mix 2X, 100 µM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, marca Promega a 15 unidades/µL) e água livre de RNAses para completar o volume final de 25 µL.

A RT-PCR foi realizada utilizando oligonucleotideos específico para detecção do LMV (PEYPELUT et al, 2004) e LeMoV (JADÃO et al., 2007) (Tabela 2). Para a detecção de tospovírus, foi usado um par de oligonucleotideo universal (EIRAS et al., 2001) (Tabela 2). Os pares de oligonucleotídeos acima citados são capazes de amplificar 278 pb, 300 pb e 450 pb, respectivamente.

O ciclo da RT-PCR utilizado na detecção do LeMoV consistiu em 30 min a 42 °C, seguido de 3 min a 95°C, 40 ciclos (95°C/ 30s, 54°C/40s e 72°C/ 30s), e 72°C durante 10 minutos. Para o LMV foram 15 min a 42 °C, seguido de 5 min a 95°C, 40 ciclos (95°C/ 20s, 54°C/20s e 72°C/ 40s) e 72°C por 10 minutos. E para tospovirus foram 30 min a 42°C, seguido de 5 min a 95°C, 40 ciclos (95°C/ 90s, 48°C/120s e 72°C/ 60s) e por fim 72°C durante 10 minutos.

**Tabela 2**. Sequências dos oligonucleotídeos para detecção do LMV (PEYPELUT et al, 2004), LeMoV (JADÃO et al., 2007) e gênero *Tospovirus* (EIRAS et al., 2001).

| Vírus | Oligonucleotídeo | Sequência |
|---|---|---|
| **LMV** | 08894p | 5'CCGTACATAGCIGARTGTGCT 3' |
| | 09171m | 5'GCGTTGATGTCGTCATCYTT 3' |
| **LeMoV** | Lmo3 | 5'ACATGAGCACTAGTGAGG 3' |
| | Lmo4 | 5'AGATAGAGCCGTCTGGCG 3' |
| **Tospovirus** | BR60 | 5'AGAGCAATCGTGTCA 3' |
| | BR65 | 5'ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT 3' |

### 4.4. Caracterização Biológica do LeMoV

#### 4.4.1. Multiplicação e Manutenção dos isolados virais

Os isolados de LeMoV e LMV foram mantidos em plantas de alface cv. Trocadero (suscetível) (Figura 1) ou em *Chenopodium quinoa* via transmissão por extrato vegetal (Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 e Carborundum como abrasivo) em casa de vegetação.



**Figura 1.** Plantas de alface com sintomas típico de mosaico, infectadas por LeMoV.

### 4.4.2. Teste de transmissão do LeMoV por semente

Em 2014, 832 sementes provenientes de plantas de alface (cv. Trocadero mol$^0$) sabidamente infectadas por LeMoV, foram colhidas e utilizadas para posterior plantio. As plantas foram cultivadas em gaiolas com telas anti-afídeos em casa de vegetação. Cerca de 45 dias após a semeadura, as 832 plantas de alface foram submetidas ao teste biológico de retro-inoculação em 52 plantas de *C. quinoa*, sendo utilizada uma *C. quinoa* para cada 16 plantas de alface. Avaliações visuais dos sintomas foram realizadas semanalmente durante 60 dias.

### 4.4.3. Teste de transmissão do LeMoV por afídeos

Duas espécies de afídeos foram utilizadas no teste de transmissão do LeMoV, *Myzys persicae* e *Aphis gossypii*, esses foram mantidos em plantas de nabo forrageiro e feijoeiro, respectivamente, ambos em gaiolas anti-afídeos em condições de casa de vegetação. Dois ensaios foram realizados para ambas espécies de afídeos.

No primeiro ensaio (I), os afídeos, foram transferidos para uma placa de Petri, onde mantiveram-se em jejum durante 40 minutos. Em seguida, os insetos foram depositados sobre folhas de alface, previamente infectadas com LeMoV, e mantidos por cerca de 40 minutos, período de aquisição viral. Após essa etapa, aproximadamente vinte afídeos foram transferidos por planta, alface cv. Trocadero, suscetível ao LMV, para um total de dez alfaces sadios (Figura 2 e 3).

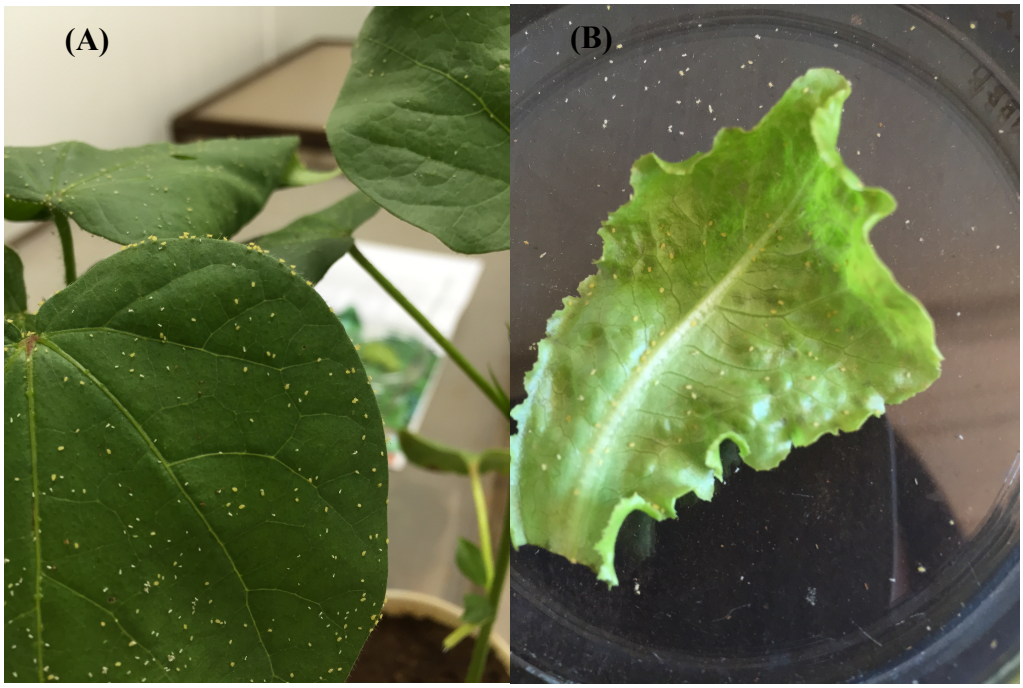



**Figura 2**. Teste de transmissão do LeMoV com *A. gossypii*, ensaio I. *A. gossypii* mantidos em planta de feijoeiro (A). *A. gossypii* durante período de aquisição viral em plantas sabidamente infectadas com LeMoV (B).

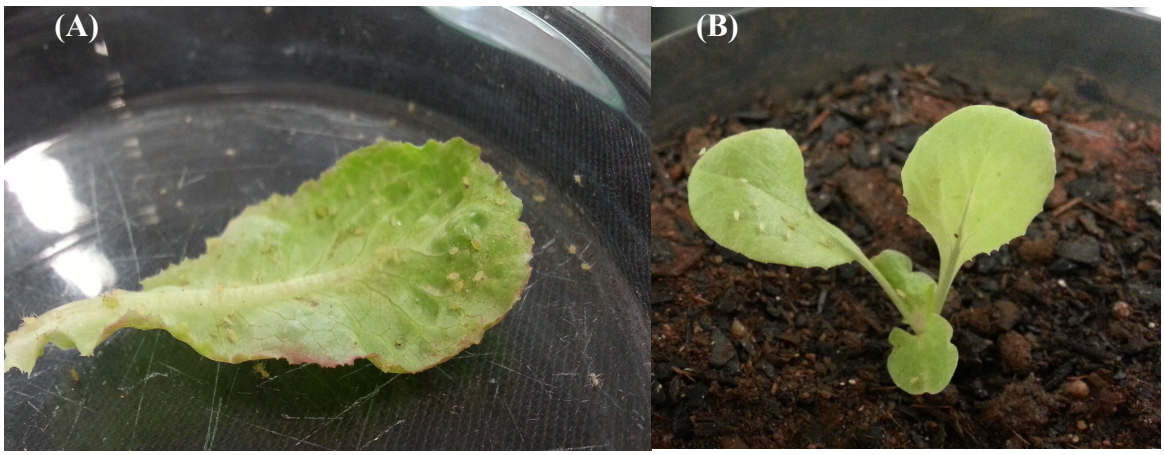



**Figura 3**. Teste de transmissão com *M. persicae,* ensaio I. Período de aquisição viral em plantas sabidamente infectadas com LeMoV (A). Plantas de alface trocadero sadias submetidas a presença de pulgões previamente utilizados na aquisição do LeMoV (B).

No segundo ensaio (II), na tentativa de simular condições naturais no campo, dez plantas de alface sadias, cv. Trocadero, e uma planta infectada com LeMoV, localizada no centro, foram mantidas em telados anti-afídeos sob condições controladas de temperatura (22$^{o}$C) e fotoperíodo (12/12h). Cerca de cem afídeos foram

depositados sobre a planta infectada e mantidos sob mesmas condições durante 40 dias (Figura 4). Em intervalos semanais, avaliações visuais dos sintomas foram realizadas.

Ambos os ensaios (I e II) foram realizados com o LMV, seguindo os mesmos procedimentos e a mesma quantidade de plantas por ensaio, servindo como controle positivo, visto que sua transmissão por ambas espécies de afídeos, *M. persicae* e *A. gossypii*, já foram anteriormente confirmadas (ABD EL-WAHAB, 2012).




**Figura 4**. Teste de transmissão com *A. gossypii*, ensaio II. Telados antiafídeos em ambiente controlado de temperatura e fotoperíodo (A). Plantas de alface cv. trocadero sadias na presença de planta infectada com LeMoV e afídeos da espécie *A. Gossypii* (B).

Posteriormente, aos 30, 45 e 60 dias, as plantas submetidas ao teste de transmissão por ambas espécies de afídeos, ensaio I e II, foram utilizadas na extração de RNA total pelo método proposto por Bertheau et al. (1998). Seguido por RT-PCR utilizando oligonucleotideos específicos para a detecção do LMV e LeMoV, com descrito anteriormente.

Os ensaios de transmissão foram repetidos duas vezes ao longo dos anos de 2013 a 2015 para a confirmação dos resultados.

### 4.5. Caracterização Molecular do LeMoV

#### 4.5.1. Obtenção de novos pares de oligonucleotídeos

Em parceria com pesquisadores do INRA – Bordeaux, França, resultados preliminares provenientes do avanço do sequenciamento do LeMoV, isolado encontrado em alface selvagem na França, auxiliaram na obtenção de novos pares de

oligonucleotídeos, visando um avanço no sequenciamento do genoma de um isolado brasileiro de LeMoV. Diferentes combinações de oligonucleotídeos foram testados, visando amplificar um fragmento maior do genoma (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequências dos pares de oligonucleotídeos obtidos para amplificação do genoma do LeMoV.

| N° de pares | Par de oligonucleotídeo | Sequência | Tamanho Fragmento |
|---|---|---|---|
| 1 | LmoAs | ATGACGTTAGCAATCCAACC | 800 bp |
| | LmoBa | GCCGTTTCGAGCCATCC | |
| 2 | LmoEs | GCAATGAAGCTTTCAGTGGC | 800 bp |
| | LmoFa | CCTCTGTCCCCAAGTGATTC | |
| 3 | LmoGs | CAGCATCACTCCCAAAGG | 800 bp |
| | LmoHa | CCTCCAAAGCTGAATCCTG | |
| 4 | LmoGs | CAGCATCACTCCCAAAGG | 1600 bp |
| | LmoJa | GACTGGTGATTGGTGTTGC | |
| 5 | LmoSs | ACGGCGCGCATTGAGAGG | 1600 bp |
| | LmoVa | CGCTGCGCCATATGCTTC | |
| 6 | LmoWs | ATGGAAAGAAGTGGCTG | 800 bp |
| | LmoXa | GAARAGAGGAGACTGTGC | |
| 7 | LmoYs | AGCGTGGATCCAGTTGGC | 800 bp |
| | LmoZa | GATACCACCAAGAGAGTCC | |
| 8 | P5s | ATGGACACAGACGGCAAC | 900 bp |
| | P10a | ACTCTGCTCAGGGCGTTG | |
| 9 | P6s | GCTGCTCAGGAAAGACAACG | 1000 bp |
| | P10a | ACTCTGCTCAGGGCGTTG | |
| 10 | P7s | GTCTACATCAAAGGCGC | 800 bp |
| | P8a | CATGAAGTGTCTCCCCTG | |
| 11 | P11s | CTCATGATGATCAGCGC | 850 bp |
| | M1a | GGTACTCAGGGCTGTTGG | |
| 12 | M7s | GCTTGTTGGACTTGCC | 830 bp |
| | P16a | CATGTCGTCCTCTTCAGC | |
| 13 | M7s | GCTTGTTGGACTTGCC | 800 bp |
| | P15a | GCGGCGTTAGGATACAT | |
| 14 | P18s | GTGTCGCTTTGAGTGTC | 1830 bp |
| | P19a | CTTCCAGTTTCATCACCTC | |
| 15 | P18s | GTGTCGCTTTGAGTGTC | 1850 bp |
| | P20a | CATTGCCGCAGTCGTCAT | |
| 16 | P18s | GTGTCGCTTTGAGTGTC | 1000 bp |
| | M11a | GCAAGATCGGCCATGGG | |
| 17 | P18s | GTGTCGCTTTGAGTGTC | 1000 bp |
| | M12a | GTCCATGCTTGCTTCCAC | |

Os pares de oligonucleotideos foram testados por RT-PCR em uma só etapa utilizando o kit de PCR, GoTaq® Green Master Mix (Promega) e transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*), num volume final de 25 ul, sendo 12,5 uL de PCR master mix 2X, 100 mM de cada oligonucleotideo, 1 unidade de transcritase reversa AMV (Promega), 2,5 ul de RNA.

Inicialmente, os pares de oligonucleotídeos iniciais foram testados, sendo separados em grupos, de acordo com sua temperatura de "melting" (Tm). A temperatura de anelamento e o tempo da etapa de extensão (72$^{o}$C) foram ajustados conforme a Tm de cada par de oligonucleotideo testado e com o tamanho do fragmento a ser amplificado, respectivamente. Testes de gradiente de temperatura também foram realizados na tentativa de melhor selecionar o Tm de cada par de oligonucleotídeo.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese horizontal, a 6 V/cm2 em gel constituído de agarose a 1% (p/v) com tampão TBE 1X (90 mM Tris; pH 8,3; 90 mM de ácido bórico e 0,1 mM EDTA), acrescido do corante Neotaq Brilliant Green Plus (7 µL/100 mL). Os géis foram visualizados e registrados em fotodocumentador BioDoc-It Imaging System (UVP, CA).

### 4.5.2. Amplificação das extremidades 5'e 3' pelo método de RACE (Rapid Amplification of cDNA ends).

Subsequentemente, para amplificação das extremidades do genoma, foi utilizado o kit: 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (Clontech), de acordo com as instruções do fabricante. Para utilização do método RACE, oligonucleotídeos denominados Gene Specific Primer (GSP) foram obtidos baseados nas sequencias do genoma, previamente amplificadas (Tabela 4). O volume final da reação foi de 50 µL, 25 µL de PCR master mix 2X, 0.4 µM de UPM long, 2 µM de UPM short, 100 µM de GSP, e 2,5 µL de cDNA. As etapas da PCR foram 5 ciclos (94°C/ 30s e 72°C/ 120s), 5 ciclos (94°C/ 30s, 70°C/ 30s e 72$^{o}$C/ 120s) e 30 ciclos (94°C/ 30s, 68°C/ 30s e 72$^{o}$C/ 180s).

Em seguida, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, contendo tampão TBE 1X (90 mM Tris; pH 8,3; 90 mM de ácido bórico e 0,1 mM EDTA), acrescido do corante Neotaq Brilliant Green Plus (7 µL/100 mL). Os géis

foram visualizados, visando a checagem dos produtos amplificados provenientes das extremidades do genoma viral.

**Tabela 4**. Sequência dos oligonucleotídeos, Gene Specific Primer (GSP), utilizados no método de RACE.

| GSP | Sequência | Extremidade |
|---|---|---|
| **RACE 1** | CATCATGGGCGCGAGTACTTTGAC | 3’ |
| **RACE 2** | GGGGCGCTGCAGCACAAAGATACG | 3’ |
| **RACE 3** | CCTAGCATGGCTGCAGCACGCCG | 5’ |
| **RACE 4** | CCATGCACATCCGCGCCCTCCTC | 5’ |
| **RACE 5** | GTCTGTGTCCATGGTGGTGTCGTG | 5’ |
| **RACE 6** | GCTCAGGCGCGATGGCTTCATGC | 5’ |
| **RACE 7** | CCTATTAGAGCCAGCGCACCTAG | 5’ |
| **RACE 8** | GTTCGGAGATCTCTTTGACCCTGC | 5’ |
| **RACE 9** | CATCGGAAGAAACGGGGACAAGGC | 3’ |

### 4.5.3. Sequenciamento e análise

Os produtos de PCR foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) e sequenciados utilizando a plataforma ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) e as reações foram realizadas com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems).

Os fragmentos amplificados e sequenciados provenientes do genoma do LeMoV foram analisados pelo programa “NCBI BLAST” (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e ClustalW (http://www.genome.jp/tools/clustalw/) e a montagem do genoma viral foi realizado com auxílio do programa MEGA 7.

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1. Levantamento do LeMoV, LMV e Tospovirus

Em 2013-2014, de um total de 118 plantas sintomáticas, 63 (53%) foram positivas para a presença de tospovírus, 11 (9%) foram positivas para LMV e, apenas 6 amostras (5%) foram positivas para LeMoV. Em 2015, quarenta amostras (80%) de todas as plantas coletadas e analisadas estavam infectadas com tospovírus, não sendo possível detectar o LMV e LeMoV (Tabela 5).

**Tabela 5**. Relação das amostras positivas para LMV, LeMoV e Tospovirus.

| Cidade / Ano | LMV | LeMoV | Tospovirus |
|---|---|---|---|
| Piedade / 2013 | 1 | 2 | 0 |
| Botucatu / 2014 | 2 | 1 | 3 |
| Campinas / 2014 | 1 | 0 | 36 |
| Biritiba Mirim / 2014 | 7 | 3 | 24 |
| Campinas / 2015 | 0 | 0 | 40 |
| **Total** | **11** | **6** | **103** |

A alta incidência de tospovirus e a baixa incidência de LMV e LeMoV no campo pode estar relacionada com as temperaturas elevadas ao longo dos últimos anos, que favorecem a reprodução dos tripes, vetor de tospovírus (CAMPO &

NEGÓCIOS HORTIFRUTI, 2014). Segundo Nondillo e colaboradores (2008), experimentos realizados em câmaras climatizadas (16, 19, 22, 25, 28 e 30°C) com fases de ovo, larva e pupa de *F. occidentalis* em morangueiro indicaram que a velocidade de desenvolvimento dessa espécie de tripes aumentou com a elevação da temperatura, sendo 25-28°C, a faixa mais adequada para seu desenvolvimento. Em contraste, os pulgões são favorecidos em temperaturas moderadas (18-25°C) (SALVADORI; PEREIRA, 2016). Cividanes e Souza (2003) observaram que temperaturas entre 23-25°C proporcionam as melhores condições térmicas para o crescimento populacional de *M. persicae*. Em condições de campo, verificou-se que os afídeos da espécie *M. persicae* apresentaram atividade mais elevada durante períodos do ano quando prevalecem temperaturas inferiores a 22 ° C (FURIATTI et al., 1993).

De acordo com a agência espacial NASA e a National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) dos Estados Unidos, o ano de 2015 foi o mais quente já registrado no planeta, a temperatura média global foi de 0,9°C superior à média registrada durante século 20, superando o recorde de 2014 que foi de 0,69°C.

Outro fator que pode favorecer a incidência de tripes e consequentemente a dispersão dos tospovirus é a estiagem registrada no ano de 2014 a 2015, caracterizada pela predominância de uma massa de ar seco sobre a região, o qual impede a chegada de frentes frias que vêm do Sul, responsáveis pelas chuvas. Dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) apontaram que o Sudeste apresentou os menores índices de chuva do país e, em alguns pontos, a precipitação foi 80% menor do que a média histórica (EDUARDO CARVALHO, 2014). Entidades de monitoramento de dados meteorológicos constataram que em janeiro o volume de chuvas em território paulista ficou bem abaixo dos 200 mm a 250 mm historicamente registrados (Instituto de Economia Agrícola, 2014).

Devido à intensa relação entre ambiente e doença em plantas, mudanças na distribuição geográfica e temporal das doenças podem ocorrer como um impacto proveniente das alterações climáticas.

## 5.2. Caracterização Biológica do LeMoV

### 5.2.1. Teste de transmissão por sementes e afídeos.

À respeito do teste de transmissão por sementes, as 832 plantas provenientes das sementes de plantas infectadas não apresentaram nenhum sintoma característico de infecção viral durante as 8 semanas de avaliações visuais, aparentemente mostraram-se negativas para a presença do LeMoV.

Assim como as alfaces provenientes das sementes de plantas sabidamente positivas com o LeMoV, as *C. quinoa* inoculadas também não exibiram sintoma de lesão local, bem como nenhum sintoma sistêmico. De acordo com programas de indexação de sementes, o teste sorológico de ELISA é adotado para detectar a presença do vírus, visto que sua detecção na semente pode ser dificultada devido a sua baixa concentração (PEREIRA et al., 2012). No entanto não há antissoros desenvolvidos para o LeMoV. Por isso, fez-se necessário a utilização da metodologia de retro-inoculação em planta suscetível, *C. quinoa*, constata por Jadão e colaboradores (2004).

De acordo com Jadão et al. (2007), as cultivares de alface Branco Boston (suscetíveis a LMV) e Elisa (cultivar resistente portador do gene $mol^1$) provenientes de semente "infectadas" com LeMoV não apresentaram sintomas visuais, sugerindo que não há transmissão por sementes, embora possa ser transmitido em uma taxa muito baixa.

O mesmo resultado negativo foi verificado quanto à transmissão do LeMoV com ambas espécies de afídeos. Não foi possível observar sintomas nas plantas submetidas aos ensaios de transmissão, ensaio I e II. Resultados preliminares de transmissão do LeMoV indicaram que *M. persicae* não é capaz de transmitir o vírus, embora seja frequentemente encontrado no campo da alface (MARINHO et al., 1982). No entanto, esses testes foram realizados há mais de 30 anos, não havia garantia que os isolados de LeMoV atualmente encontrado no campo apresentam as mesmas características epidemiológicas, dessa forma surgiu a importância da confirmação dos testes que poderiam manifestar-se de modo diferente, devido as mutações no genoma viral ao longo dos anos.

Em relação ao controle positivo, todas as alfaces submetidas ao teste de transmissão do LMV, ensaio I e II, utilizando ambas espécies de afídeos, *M. persicae* e *A. gossypii,* exibiram sintomas característicos de mosaico. A eficiência na

transmissão do LMV possibilitou maior confiabilidade dos resultados obtidos nesse trabalho, visto que segundo Abd El-Wahab (2012), a transmissão desse vírus com ambas espécies já foi anteriormente confirmada.

O ensaio II, realizado na tentativa de simular as condições naturais do campo, proporcionou um ambiente favorável ao desenvolvimento da doença, pois haviam plantas sadias de alface e uma planta sabidamente positiva com o LeMoV na presença de afídeos. Esse ensaio permitiu um livre período de aquisição viral, tal qual ocorre no campo, diferentemente do ensaio I, onde os afídeos permaneceram em período de aquisição por 40 minutos. Ou seja, o presente trabalho considerou a possibilidade do LeMoV ser transmitido de forma não-persistente ou semi-persistente.

Os resultados negativos de transmissão do LeMoV por afídeos foram confirmados através das análises moleculares. A RT-PCR pra detecção do LeMoV e LMV utilizando os oligonucleotídeos específicos, seguida da eletroforese em gel de agarose mostrou a ausência de bandas amplificadas para o LeMoV (Figura 5), enquanto que para o controle positivo, o LMV, foi possível observar a presença das bandas (Figura 6), o que indica que o teste de transmissão foi eficiente. Os resultados em conjunto sugerem que mais estudos são necessários a fim de melhor explicar a transmissão de LeMoV no campo.

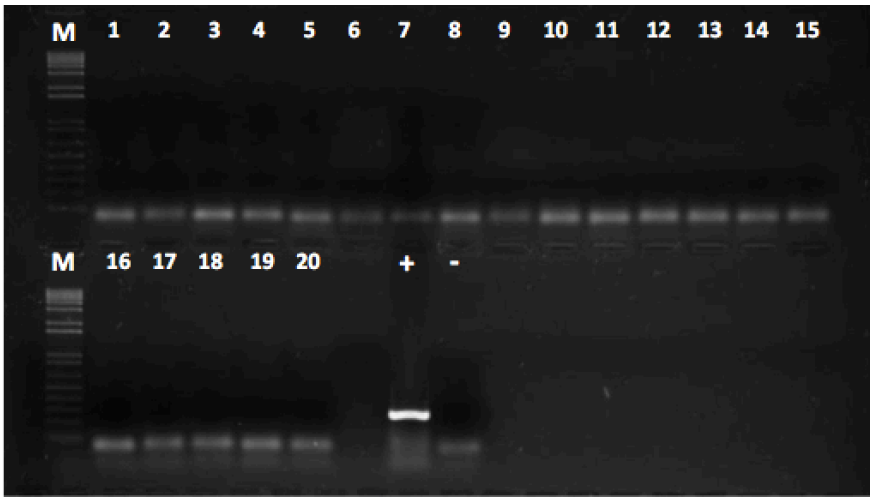



**Figura 5**. Gel de agarose a 1% com reações de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para LeMoV (parcial RdRp), Lmo3/Lmo4. (M) Marcador 1 kb Plus DNA ladder; (1 a 10) Amostras referentes ao teste de transmissão com *A. gossypii*, ensaio I. (11 a 20) Amostras referentes ao teste de transmissão com *A. gossypii*, ensaio II. (+) Controle positivo para LeMoV. (-) Controle negativo. O tamanho do fragmento amplificado para o controle positivo foi de 278 pb.

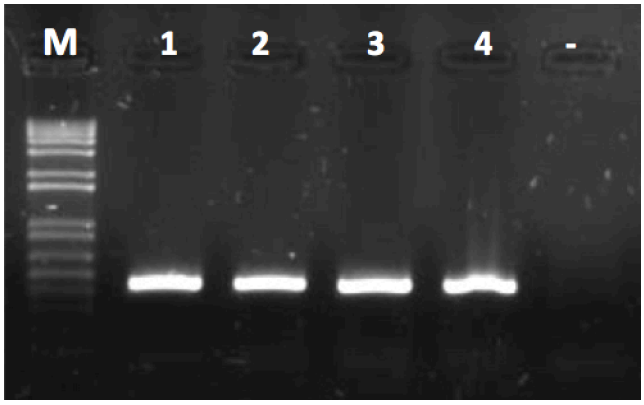



**Figura 6**. Gel de agarose a 1% com reações de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para LMV, 08894p e 09171m. (M) Marcador 1 kb Plus DNA ladder; (1 a 4) Quatro amostras positivas para LMV referentes ao teste de transmissão com *A. gossypii* e *M. persicae*, ensaio I e II, respectivamente. (-) Controle negativo. O tamanho do fragmento amplificado foi de 300 pb.

## 5.3. Caracterização Molecular do LeMoV

### 5.3.1. Teste de eficiência dos oligonucleotídeos

Os fragmentos amplificados foram obtidos através de diferentes combinações de oligonucleotídeos, totalizando 17 pares em diferentes posições ao longo do genoma do LeMoV (Figura 7) e amplificando fragmentos entre 800 a 1850 bp.

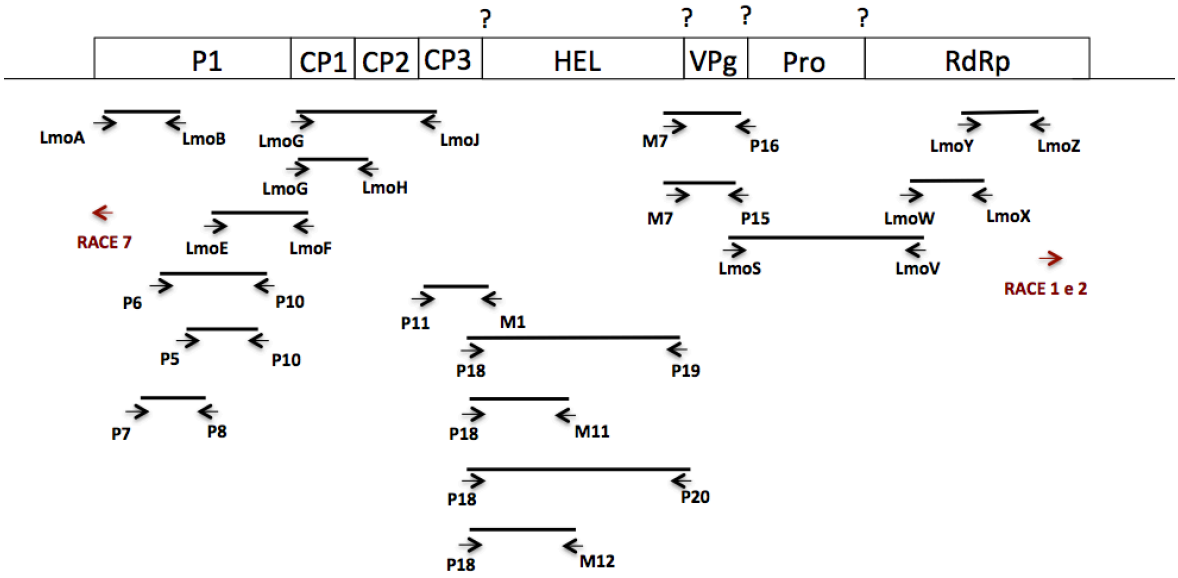



**Figura 7.** Posição dos 17 pares de oligonucleotídeos e dos GSPs (Race 1, 2 e 7) eficientes no sequenciamento do genoma do LeMoV.

O alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos (8364 nt) e da sequencia parcial de aminoácidos da poliproteína do LeMoV (2788 aa), entre os isolados do Brasil e da França, realizadas através do programa ClustalW mostraram cerca de 84% e 96% de identidade, respectivamente.

No método de RACE, dentre os Gene Specific Primer (GSP) utilizados, apenas: Race1, Race2 e Race7 foram eficientes e capazes de amplificar parcialmente as extremidades do genoma do LeMoV (Figura 7). O Race 1 e Race 2 amplificou cerca de 700 pb na extremidade 3' do genoma. A extremidade 5 ' foi amplificada utilizando o Race7, responsável pela amplificação de cerca de 450-500 pb.

Contudo, não foi possível obter a sequencia completa da região codificadora da poliproteína (região traduzida - TR), bem como das extremidades, 5' e 3' do genoma viral, incluindo as respectivas regiões não traduzidas (UTR's).

### 5.3.2. Análise molecular do LeMoV

A organização genômica dos fragmentos sequenciados do LeMoV foi realizada com auxílio do programa MEGA7. Cerca de 8,4 kb proveniente da poliproteína foram sequenciados, o qual correspondem a 2788 aminoácidos (Apêndice 2). O isolado brasileiro de LeMoV apresentou domínios putativos conservados na região da capa proteica (CP), na helicase (HEL) e na RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) (Figura 8).

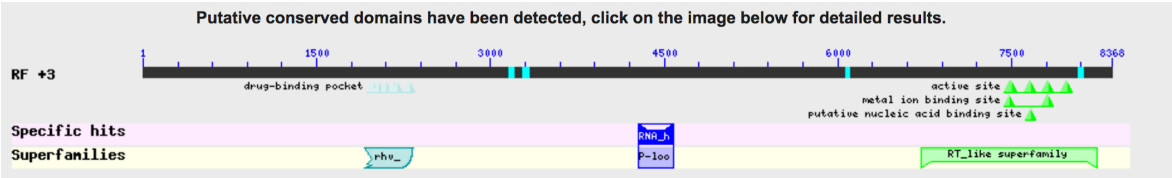



**Figura 8**. Domínios putativos conservados detectados na sequência parcial da poliproteína do LeMoV, obtidos através da análise com o BLAST- Basic Local Aligment Search Tool, domínio da CP (azul claro), domínio na helicase, o P-loop (azul marinho) e domínio da polimerase, a GDD (verde) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

A região da proteína capsidial do isolado de LeMoV sequenciado exibiu um domínio comum aos picornavirus (capsid domain_like), o qual apresenta uma estrutura comum denominada "8-stranded beta sandwich" (MARCHLER-BAUER et al., 2015). O domínio β-sandwich ou beta barril confere a proteína seu rearranjo característico

(KISTER et al., 2006), um domínio estrutural "jelly roll" característico da proteína capsidial dos vírus (JONES et al., 1989; CHENG et al., 2013), também encontrado nos sequivirus, que apresentam três CPs, onde cada uma contém um domínio único "jelly roll" (SANFAÇON et al., 2012) .

Na região da helicase foi possível encontrar a sequencia de aminoácidos **G**SP**G**V**GKS**, localizado na posição 1427-1435 aa, referente ao motivo P-loop, associada a ligação fosfato, no qual possui um motivo conservado padrão (**G**XXXX**GK**[**S**/T]) (WALKER et al., 1982), conhecido também como motivo "A" da helicase (GORBALENYA et al., 1990). Seguido do motivo "A", foi observado o motivo putativo "B" (DD) detectado na posição 1478-1479 aa. Na sequência, identificamos o motivo "C", **KG**RTFT**S**KYIF**STTN** (KGxxxxSxxxxx(S/T)(S/T)N), na posição 1514-1528 aa (Apêndice 2). Do mesmo modo, Turnbull-Ross e colaboradores (1992) apontaram a presença do domínio conservado da helicase (**G**/A)XX**G**X**GK** (**S**/T) e o domínio D(D/E) na poliproteina do PYFV, espécie tipo do gênero *Sequivirus*.

Na região da polimerase foi detectado o motivo GDD, localizado na posição 2601-2603 aa. Este motivo conservado está presente nas RdRp (ARGOS, 1988). Além do motivo VI (GDD), foi identificado o motivo V, o qual exibe a sequencia de aminoácidos **PSG**FPM**T**VIF**NS** (PSGxxxTxxxN(S/T) (HANSEN et al., 1997) na posição 2551-2562 aa.

De acordo com "International Committee Taxonomy of Viruses" (ICTV) a região da Pro-Pol está localizada entre o motivo "CG" da 3C-like proteinase e o motivo "GDD" da polimerase (SANFAÇON et al., 2012), esta região vem sendo utilizada para determinar o relacionamento entre os picornavirales (LE GALL et al., 2008). Portanto, análises filogenéticas utilizando a região da Pro-Pol para membros da família *Secoviridae*, incluindo o LeMoV sequenciado nesse trabalho, revelou que o isolado de LeMoV está mais próximo filogeneticamente das espécies PYFV (D14066) e CNDV (EU980442) pertencentes ao gênero *Sequivirus* (Figura 9). No entanto, embora o LeMoV não esteja no mesmo ramo filogenético dos sequivirus, não há informações suficientes que assegurem a criação de um novo gênero.

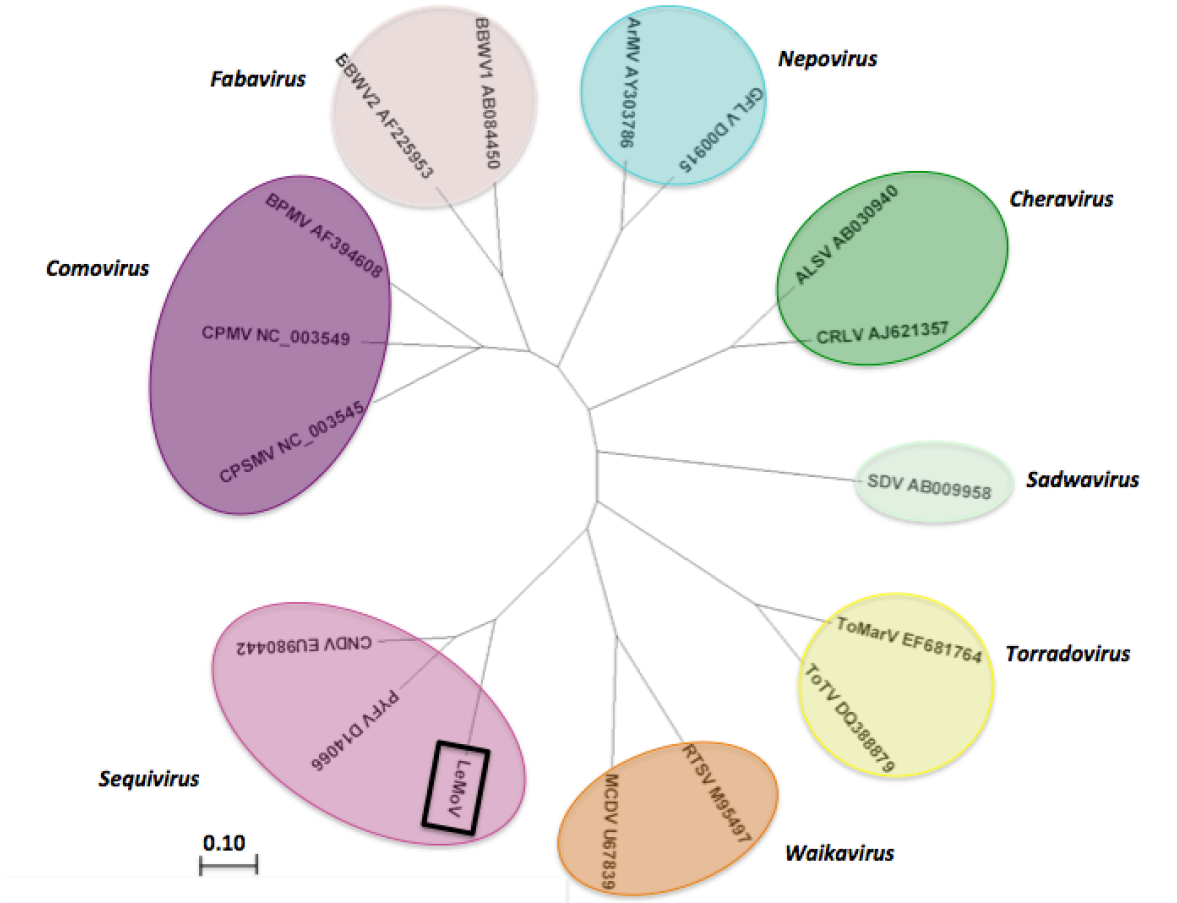



**Figura 9**. Árvore filogenética gerada para a sequência de nucleotídeos da Região da Pro-Pol, do isolado de LeMoV comparados com outras espécies da Família *Secoviridae*. A árvore foi construída pela método neighbour-joining com o programa MEGA 7.0 Bootstrap (2,000 replicatas).

Em relação as análises moleculares baseadas na região parcial codificadora da polimerase, o isolado de LeMoV apresentou cerca de 95.7% de identidade de nucleotídeos (nt) com o isolado brasileiro AF197 de LeMoV (DQ675190.1), 96.3% com isolado brasileiro Br11 **(**DQ675191.1), 82.9% com o isolado chileno Ch36 (AM039965.1), 64% com PYFV (EU980442.1), 60% com PYFV (NC_003628) e 62.3% com DYMV (DQ675189.1) (Tabela 6) (Apêndice 3).

**Tabela 6**. Porcentagem de identidade de nucleotídeos para região parcial codificadora da polimerase (RNA dependente de RNA polimerase – RdRp) entre os isolados de LeMoV disponíveis no GenBank (DQ675190.1; DQ675191.1; AM039965.1) e outras espécies de sequivirus disponíveis no GenBank (NC_003628, EU980442 e DQ675185).

| Sequências de nucleotídeo | LeMoV | LeMoV DQ675190.1 | LeMoV DQ675191.1 | LeMoV AM039965.1 | PYFV NC_003628 | PYFV EU980442 | DYMV DQ675185 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LeMoV | **100** | 95.7 | 96.3 | 82.9 | 60.0 | 64.0 | 62.3 |
| LeMoV (DQ675190.1) | | **100** | 97.7 | 82.6 | 60.3 | 64.0 | 62.6 |
| LeMoV (DQ675191.1) | | | **100** | 83.4 | 60.7 | 64.2 | 62.6 |
| LeMoV (AM039965.1) | | | | **100** | 61.0 | 64.2 | 64.4 |
| PYFV (NC_003628) | | | | | **100** | 69.6 | 61.6 |
| PYFV (EU980442) | | | | | | **100** | 61.0 |
| DYMV (DQ675185) | | | | | | | **100** |

Estudos filogenéticos realizados com a sequencia parcial obtida para o LeMoV (562 nt) revelam que o LeMoV sequenciado nesse trabalho está mais próximo filogeneticamente dos isolados brasileiros de LeMoV, isolado AF197 e Br11 (DQ675190.1 e DQ675191.1), enquanto o isolado ch36 (AM039965) encontra-se mais distante. As duas espécies de PYFV (NC_003628 e EU980442) formaram um clado distinto, separadamente do DYMV (DQ675185) (Figura 10).

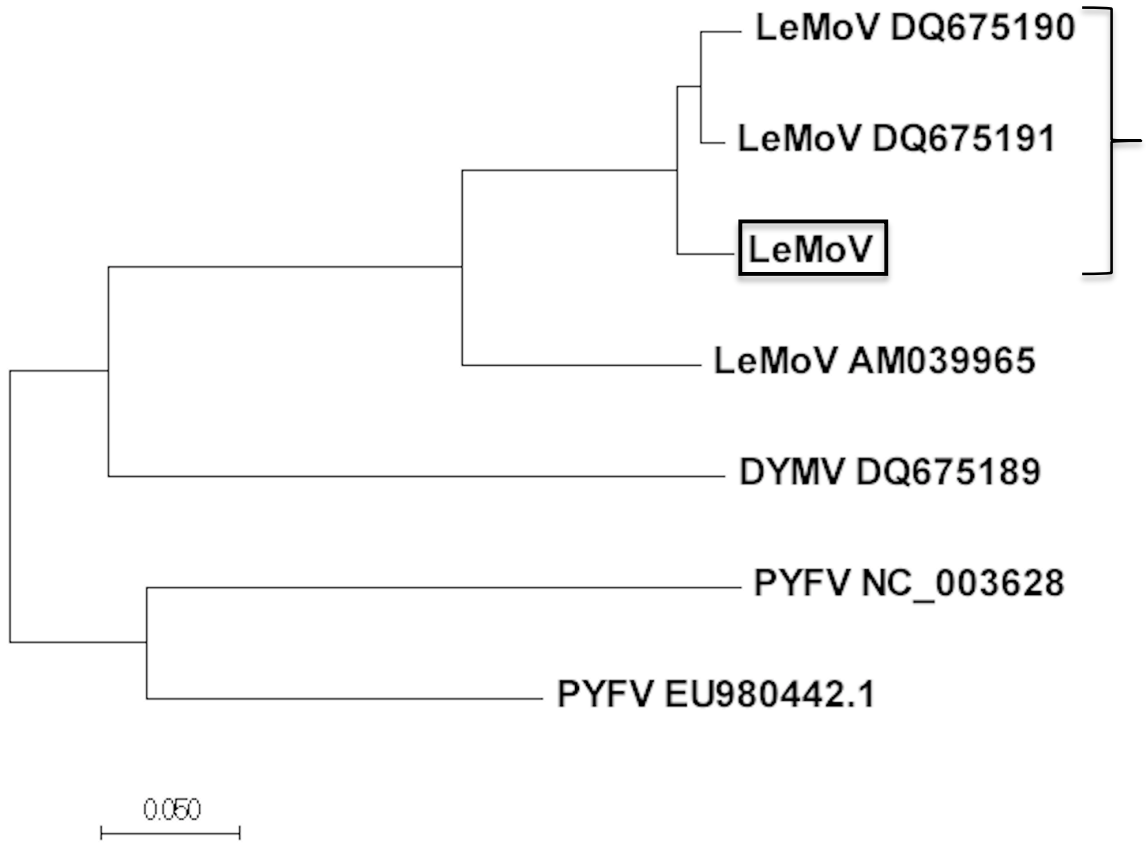



**Figura 10**. Árvore filogenética gerada para a sequência parcial de nucleotídeos da polimerase para isolados brasileiros e um isolado chileno de LeMoV, comparados com outras espécies pertencentes ao gênero *Sequivirus*. A árvore foi construída pela método neighbour-joining com o programa MEGA 7.0 Bootstrap (2,000 replicatas).

Desta forma os dados obtidos neste trabalho possibilitam concluir que o LeMoV é um provável sequivirus não transmitido pela semente de alface bem como pelas espécies de afídeos testados, cuja transmissão no campo ainda é desconhecida**.**

## 6. REFERÊNCIAS

ABD EL-WAHAB. Transmission Efficiency of *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) by Different Aphid Species and New Aphid Vectors in Egypt. **Academic Journal of Entomology**, v. 5 (3), p. 158-163, 2012.

ARGOS, P. A sequence motif in many polymerases. **Nucleic Acid Research**, v. 16, p. 9909-9916. 1988.

BERTHEAU, Y.D., et al. Methods for the Detection and Quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica on Potatoes. M. C. N. Perombelon and J. M. van der Wolff, eds. **Scottish Crop Research Institute**, Dundee, U.K., 1998.

CAMPO & NEGÓCIOS HORTIFRÚTI. **Surto mundial de vira-cabeça deixa setor em alerta:** Entre as culturas mais afetadas estão o tomate e a alface, que já amargaram prejuízos de 100%, devido à morte rápida da planta. Uberlândia, 2014. Disponível em: <http://www.revistacampoenegocios.com.br/surto-mundial-de-vira-cabeca-deixa-setor-em-alerta/>. Acesso em: 20 jun. 2016.

CARVALHO, C et al. **Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2013**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Cruz, 2013. p. 88.

CHAVES, A.L.R . Interações do ***Lettuce*** *mosaic virus* (LMV) x afídeos vetores nas regiões produtoras de alface (*Lactuca sativa* l.) do cinturão verde de São Paulo, 2006, 130f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, Botucatu, 2006.

CHENG, S.; BROOKS, C. L. Viral Capsid Protein Are Segregated in Strutural Fold Space. **Plos Computational Biology**, v. 09, 2013.

CIVIDANES, F. J.; SOUZA, V. P. Exigências térmicas e tabela de vida de fertilidade de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: *Aphididae*) em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 413-419, 2003.

COLARICCIO, A., CHAVES, A.L.R., EIRAS, M., ROGGERO, P., PALAZZO, S.R.L., COSSA, A.C. Diversidade de fitovírus em asteráceas no cinturão verde de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.1., p.63, 2003.

DE MARCHI, B.R., SPADOTTI, D.M.A, OLIVEIRA, M.L., SANCHES, M.M., KRAUSE-SAKATE, R., PAVAN, M.A. Levantamento revela a predominância do Lettuce mottle virus em três regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 245-247, 2012.

EIRAS, MARCELO et al . RT-PCR and Dot Blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 170-175, 2001.

FIRMINO, A. C., KRAUSE-SAKATE, R., PAVAN, M.A., SILVA, N., HANAI, S.M., ANBO, R.H., NIETZSCHE, T., Le GALL, O. Prevalence of Lettuce mosaic virus - common strain on three lettuce producing areas from São Paulo State. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.2, p.161-163, 2008.

FURIATTI, R.S. & A.A. ALMEIDA. Flutuação populacional dos afídeos *Myzus persicae* (Sulzer, 1778) e *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) (Homoptera: Aphididae) e sua relação com a temperatura. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 37, p. 821-826, 1993.

GLOBO (Ed.). **Ano de 2015 foi o mais quente já registrado no planeta, confirma Nasa**: Média da Terra no ano passado foi 0,90ºC acima da média do século 20. Recorde anterior, de 2014, foi superado em 0,16ºC. 2016. Disponível em: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2016/01/o-ano-de-2015-foi-o-mais-quente-ja-registrado-no-planeta-confirma-nasa.html>. Acesso em: 20 jan. 2016.

GORBALENYA AE, KOONIN EV, WOLF YI. A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNAviruses. **FEBS** Lett, v. 262, p. 145–148, 1990.

HANSEN, J. L., A. M. LONG, and S. C. SCHULTZ. "**Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus.**" Structure (Camb.) v. 5, n.8: 1109-22, 1997.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de Alface Cultivados no Brasil**. EMBRAPA – Comunicado Técnico. Brasília: DF, 2009.

HULL, R. Matthews Plant Virology. 4 ed. San Diego: Academic Press, 2002. 1001p.

JADÃO, A. S. et al. Caracterização parcial e desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para detecção de *Sequivirus* infectando alface. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

JADÃO, A. S.; Krause-Sakate, R.; Liberti, D.; Pavan, M. A.; Echer, M. M.; SVANELLA-DUMAS, L.; , ZERBINI, F. M.; CANDRESSE, T. & LE GALL, O. Further characterization of two sequiviruses infecting lettuce and development of specific RT-PCR primers. **Archives of Virology**, Vienna, v. 152, p. 999–1007, 2007.

JONES EY, STUART DI, WALKER NP. Structure of tumour necrosis factor. **Nature,** v. 338: 225–228, 1989.

KISTER, A. E.; FOKAS, A. S.; PAPATHEODOROU T. S., GELFAND I. M. Strict rules determine arrangements of strands in sandwich proteins. **PNAs**, v. 103, n. 11, p. 4107-4110, 2006.

KRAUSE-SAKATE, R., LE GALL, O., FAKHFAKH, H., PEYPELUT, M., MARRAKCHI, M., VARVERI, C., PAVAN, M.A., SOUCHE, S., Lot, H., ZERBINI, F.M., CANDRESSE, T.. Molecular characterization of *Lettuce mosaic virus* field isolated reveals a distinct and widespread type of resistance breaking isolate: LMV-Most. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.563-572, 2002.

KRAUSE-SAKATE R, JADAO AS, FIRMINO AC, PAVAN MA, ZERBINI FM, ROSALES IM, BUSTAMANTE P, LE GALL O. First report of a lettuce-infecting sequivirus in Chile. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 1129, 2005.

KRAUSE-SAKATE, R., FIRMINO, A.C., JADÃO, A.S., PAVAN, M.A., da SILVA, N., HANAI, S.M., ANBO, R.H., NIETZSCHE, T. Ocorrência generalizada do Lettuce mottle virus em três regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 88-89, 2008.

LE GALL O, CHRISTIAN P, FAUQUET CM, KING AM, KNOWLES NJ, NAKASHIMA N, STANWAY G, GORBALENYA AE. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single stranded RNA viroses with a pseudo-T = 3 virion architecture. **Archieve of Virology**, Vienna, v. 153, p. 715–727, 2008.

MARCHLER-BAUER A, DERBYSHIRE MK, GONZALES NR, LU S, CHITSAZ F, GEER LY, GEER RC, HE J, GWADZ M, HURWITZ DI, LANCZYCKI CJ, LU F, MARCHLER GH, SONG JS, THANKI N, WANG Z, YAMASHITA RA, ZHANG D, ZHENG C, BRYANT SH. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research** 2015 Jan 28;43 (Database issue):D222-2. doi: 10.1093/nar/gku1221. Epub 2014 Nov 20.

MARINHO, V.L.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. & COSTA, C.L.. Caracterização do vírus do mosqueado da alface. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.7, n.3, p.543, 1982.

MARINHO VLA, KITAJIMA EW. Virus do mosqueado da alface – um virus isométrico transmitido por afideo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 11, p. 923–936, 1986.

NONDILLO, A; REDAELLI, L.R.; BOTTON, M.; PINENT, S. M. J.; GITZ, R. Exigências Térmicas e Estimativa do Número de Gerações Anuais de Frankliniella occidentalis (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) em Morangueiro. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 646-650, 2008.

PEYPELUT, M.; KRAUSE-SAKATE, R.; GUIRAUD, T.; PAVAN, M.A.; CANDRESSE, T.; ZERBINI, F.M.; LE GALL, O. Specific detection of *Lettuce mosaic virus* isolates belonging to the "Most" type. **Journal of Virological Methods,** London, v. 121, p. 119-124, 2004.

PEREIRA, L. S.; CHAVES, A. L.R.; FILHO, J. A. A; COLARICCIO, A. Indexação do *Lettuce mosaic virus* em sementes e plântulas de genótipos de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, p. 628-635, 2012.

RESENDE, J.A.M. & CUPERTINO, E.P. Doenças em hortaliças. Informe Agropecuário 18, 18-27p. 1995.

SALVADORI, José Roberto; PEREIRA, Paulo Roberto V.s. (Ed.). **Pulgões.** EMBRAPA. Disponívelem:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia35/AG01/arvore/AG01_90_259200616453.html>. Acesso em: 20 jul. 2016.

SANFAÇON, H., GORBALENYA, A.E., KNOWLES, N.J. & CHEN, Y. Picornavirales. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. pp 835-839. San Diego: Elsevier. 2011.

STANGARLIN, O. S. **Identificação dos vírus causadores de mosaico em cultivares de alface (*Lactuca sativa L.)* resistente ao vírus do mosaico da alface nas regiões produtoras do Estado de São Paulo.** 1995. 72 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

TURNBULL-ROSS,A.D., REAVY,B, MAYO,M.A., MURANT,A.F. The nucleotide sequence of Parsnip yellow fleck virus: a plant picorna-like virus. **Journal of General Virology**, Reading, v. 73, p. 3203-3211. 1992.

WALKER, J. E.; SARASTE M.; RUNSWICK, M. J.; GAY N. J. Distantly related sequences in the α- and β- subunit of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP – requiring enzymes and a common nucleotide biding fold. **The EMBO Journal**, v1. n 8, p. 945-951, 1982.

Instituto de Economia Agrícola (Ed.) **Pesquisadores do IEA avaliam os efeitos da falta de chuva sobre as lavouras paulistas:** Desde o final de 2013, o clima no centro-sul do Brasil tem se caracterizado pela escassez de chuvas, baixa umidade relativa do ar e alta incidência de luminosidade. 2014. Portão Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.saopaulo.sp.gov.br/spnoticias/salaimprensa/home/imprensa_lenoticia.php?id=235902>. Acesso em: 22 nov. 2016.

EDUARDO CARVALHO (São Paulo). **Agricultura de SP pode ter maior prejuízo em 50 anos devido à seca:** Culturas como a do café, cana, milho, feijão e frutas cítricas tiveram perdas. Estiagem na agricultura foi a pior desde 1963, segundo órgão do governo.. 2014. G1. Disponível em: <http://g1.globo.com/sao-paulo/noticia/2014/11/agricultura-de-sp-pode-ter-maior-prejuizo-em-50-anos-devido-seca.html>. Acesso em: 22 nov. 2016.

# CAPÍTULO II

## "SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DE VÍRUS EM JASMIM ESTRELADO"

**Sequenciamento de Nova Geração de Vírus em Jasmim estrelado**

## 1. RESUMO

Plantas de jasmim estrelado apresentando sintomas foliares de viroses foram coletadas na ilha de Oahu, Honolulu, Hawaii, Estados Unidos, e investigadas por deep-sequencing a partir da dupla fita de RNA (dsRNA) e da construção de uma biblioteca genômica. A dupla fita de RNA (dsRNA) isolada de folhas sintomáticas mostraram bandas de aproximadamente 4.2 e 1.6 kbp no gel de eletroforese. Contigs apresentando significativa similaridade com vários membros putativos da família *Tombusviridae* foram analisadas. Dados gerados a partir das análises do sequenciamento tradicional e de nova geração revelaram a presença de novos vírus relacionados, semelhantes aos membros da família *Tombusviridae*. Análises das sequências de aminoácidos provenientes da RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) e da capa proteica (CP) indicam que os vírus apresentam maior identidade com membros pertencentes ao gênero *Pelarspovirus*, tais como *Rosa rugosa leaf distortion virus*, *Pelargonium ringspot virus*, *Pelargonium chlorotic ring pattern virus* e *Elderberry latent virus*.

Palavras-chave: dsRNA, deep-sequencing, *Tombusviridae*, *Pelarspovirus*.

**Next Generation Sequencing of viruses from Star Jasmine**

## 2. SUMMARY

Star jasmine (*Jasminum multiflorum* L.) plants expressing a diverse array of virus-like foliar symptoms were collected on the island of Oahu, Hawaii and investigated by deep-sequencing of its double-stranded RNA (dsRNA) and by contruction of a library. DsRNA isolated from symptomatic leaves consistently showed bands of approximately 4.2 and 1.6 kbp in gel electrophoresis. Contigs showing significant similarity to various putative members of the family *Tombusviridae* were analyzed. Conventional and high-throughput sequencing of a library revealed the presence of several related viruses most similar to putative members of the family *Tombusviridae*. Sequence analysis of the deduced RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and the coat protein (CP) amino acids indicate that the viruses show higher identity with members belonging to genus, *Pelarspovirus*, such as *Rosa rugosa leaf distortion virus*, *Pelargonium ringspot virus*, *Pelargonium chlorotic ring pattern virus* and *Elderberry latent virus*.

Keywords: dsRNA, deep-sequencing, *Pelarspovirus*, *Tombusviridae*.

## 3. INTRODUÇÃO

Jasmim estrelado (*Jasminum multiflorum*) pertence a família Oleaceae, é considerada uma planta ornamental utilizada em decoração de ambientes e jardins (MAMILLIAN, 1954; OGUNDIPE et al., 1998), seu óleo é utilizado como matéria prima na elaboração de perfumes e cosméticos (HEGNAER, 1982; BURKILL et al., 1985). É uma planta perene, um arbusto com ramos jovens aveludados; folhas simples, ovaladas, opostas e com base arredondada (GANATRA et al., 2013).

Plantas de jasmim estrelado podem apresentar sintomas ocasionados por vírus tais como mosqueado, anéis e linhas cloróticas. No estado da Flórida, plantas da jasmim estrelado (*J. multiflorum)* e jasmim ceroso foram diagnosticadas com tobamovirus, *Tomato mosaic virus* (ToMV), sendo o primeiro relato do vírus no Estados Unidos (KAMENOVA; ADKINS, 2006). Na Índia, plantas de jasmim (*J. Sambac)* estavam infectadas com *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV, gênero *Tospovirus*) (SUJITHA et al., 2013).

Na ilha de Oahu, Honolulu, Hawaii, plantas de jasmim estrelado comumente encontradas em jardins e parques vem exibindo uma ampla gama de sintomas foliares característicos aos sintomas provocados por vírus, tais como manchas anelares, linhas cloróticas, mosaico, mosqueado e deformação, frequentente na mesma planta. Essas

plantas vem sendo estudadas na Universidade do Hawaii em Manoa, contribuindo com a suspeita de que estão infectadas por prováveis vírus pertencentes a família *Tombusviridae*.

Atualmente, dezesseis gêneros pertencem a essa família,: *Tombusvirus*, *Pelarspovirus*, *Alphacarmovirus*, *Alphanecrovirus, Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Machlomovirus*, *Alphanecrovirus*, *Betanecrovirus, Betacarmovirus*, *Panicovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Macanavirus, Umbravirus* e *Zeavirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS, 2015).

Algumas características gerais dos membros da família são: o genoma não apresenta o CAP na extremidade 5' e nem a cauda Poly(A) na extremidade 3'. O comprimento do genoma de RNA é de 3500 a 4200 nucleotídeos. A maquinária de replicação viral requer uma leitura através do códon da ORF1 para produzir a RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) (CASTAÑO et al., 2009), os membros do gênero *Pelarspovirus* produzem dois RNAs subgenômicos. Há a ocorrência de um único tipo de proteína capsidial e uma ou mais proteínas de movimento (SCHEETS et al., 2015).

Os membros do proposto gênero *Pelarspovirus* são*: Elderberry latent virus* (ELV), *Pelargonium chlorotic ring pattern virus*, (PCLPV) *Pelargonium ringspot virus* (PRSV) e *Rosa rugosa leaf distortion virus* (RLDV). Eles formam um grupo separado nas análises filogenéticas, no qual o membro tipo é o PRPV.

Recentemente foi proposto que para a inclusão de uma nova espécie no gênero *Pelarspovirus*, esta deve apresentar <75% de identidade de aminoácidos entre a RdRp e <75 % de identidade entre as CPs (SCHEETS et al., 2015). Baseado na proximidade nas relações filogenéticas dos grupos, dois novos vírus identificados como membros do proposto gênero *Pelarspovirus*, foi proposto a inclusão do JCMV-1 e JCMV-2 dentro desse gênero, de acordo com o convencional International Committee of Taxonomy for viruses (ICTV).

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Sequenciamento de Nova Geração Aplicado a Novos Patógenos Virais

### 4.1.1. Extração dsRNA

Plantas sintomáticas de jasmim estrelado (Figura 1), exibindo uma ampla gama de sintomas foliares característicos aos provocados por vírus, tais como manchas anelares, linhas cloróticas, mosaico, mosqueado e deformação foliar, foram coletadas na ilha de Oahu, Hawaii, EUA, e direcionadas ao laboratório de Virologia, Department of Plant and Environmental Protection Sciences (PEPs) na University of Hawaii at Manoa (UH), onde foram analisadas.



**Figura 1**. Plantas de jasmim estrelado coletadas na ilha de Oahu, Honolulu, Hawaii, Estados Unidos.

Posteriormente, cerca de 5-10g de folhas foram utilizadas para isolamento da dupla fita de RNA (MORRIS; DODDS, 1979; BAR-JOSEPH et al., 1983; DODDS et al., 1984). O tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido, em seguida adicionado 200 ml de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, NaCl, EDTA 10 mM, pH 8,0, SDS 10% e mercaptoetanol 1%), seguido de agitação por 45-60 minutos a 4° C. Após centrifugação em rotor GSA a 8000 rpm, durante 10 minutos, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 0,2 volumes de etanol e 2 g de CF-11, celulose em pó, sendo suavemente agitada durante 1-2 horas em temperatura ambiente.

A amostra foi submetida a filtração em filtro GF/C (Whatman) e lavada com 100 ml de STE 1X (NaCl 1 M, 200 mM de Tris-HCl e 100 nM de EDTA, pH 8,0) contendo 16.5% (v/v) de etanol. A dsRNA foi eluida em tubo de 50 mL contendo 5 mL de STE 1X. Em seguida, foi adicionado 0,2 volumes de etanol e 1,5 g de CF-11, agitando cuidadosamente durante 30 minutos em temperatura ambiente. As etapas de filtragem e lavagem, descritas anteriormente, foram novamente realizadas. A dsRNA foi eluida em tubo de 15 ml com três alíquotas de 3 ml de STE 1X, seguido de centrifugação por 1 minuto. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um tubo de 30 ml. A seguir, 0,9 ml de $CH_3COONa$ 3M (pH 5,2) e 20 ml de etanol 95% foram adicionados. O tubo foi selado com parafilme, homogeneizado e incubado a -20$^{o}$C overnight.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 30 minutos, o “pellet” final foi ressuspendido em 500 ul de água livre de RNAses. A dsRNA foi concentrada utilizando colunas, YM-30 (Concentration and Purification of

Biological Solutions-Centrifugal Filter Unites - Millipore), servindo de molde para a síntese de cDNA.

### 4.1.2. Síntese de cDNA

Inicialmente, dsRNA extraído foi desnaturado a 95°C durante 8-10 minutos utilizando 2µl de dsRNA e 1µl (10ρmol) do oligonucleotídeo randômico 470 (5'CCGGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNNN-3') e rapidamente colocado no gelo. Foram adicionados a reação: 1 µl da Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (RT AMV) (Promega), 4 µl de RT Buffer, 4 µl de dNTPs e 8 µl de água, totalizando 20 µl. A reação foi incubada a 37°C durante 90 minutos para a realização da etapa de extensão, em seguida o excesso de RNA e de oligonucleotídeos foram removidos utilizando colunas YM-30. Vinte microlitros do eluido da coluna foi utilizado como "primer/template" em uma reação de overlap-extension PCR, adicionando mais 20 µL de 2X GoTaq Green Master Mix (Promega). O ciclo da reação foi de 95°C por 7 minutos; 10 ciclos (95°C/ 60s, 55°C/ 60s, 72°C/ 60s); e 72°C por 7 minutos. Uma segunda PCR foi realizada, contendo 1 µl da reação de overlap-extension PCR, 2µl (20 pmol) do primer, 469 (5'CCGGGAGCTCTGCAGAATTC-3'), 10µl de 2X GoTaq Green Master Mix (Promega) e 7 µl de água RNAse-free. O ciclo consistiu de 7 minutos a 95 °C; 35 ciclos (60s/ 95°C, 60s/ 58°C e 60s/ 72°C) e 7 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% para a confirmação do padrão eletroforético, representado por um "smear", um borrão, caracterizado por diversos fragmentos de diferentes tamanhos.

### 4.1.3. Clonagem e Sequenciamento

Inicialmente, a etapa de ligação foi realizada através da inserção do fragmento no vetor PGEM-T easy utilizando o produto de PCR. Nessa etapa foram utilizadas as seguintes soluções: 5µL de tampão 2X, 0,5µL de ligase (enzima), 0,5µL do vetor PGEM-T easy e 4µL do PCR purificado.

Em um microtubo contendo 100ul de células competentes de *Escherichia coli* da estirpe DH5α preparadas para choque térmico, 5ul da ligação foi adicionado e em seguida, incubada no gelo por uma hora, sendo posteriormente aquecida a

42°C por 45 segundos. O microtubo foi colocado ao gelo, 400ul de SOB/SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM $MgSO_4$, pH 7,0 + 20 mM glicose) foram acrescentados, bem como 2ul de $MgCl_2$ 2M. A reação foi incubada a 37°C por 45 minutos, proporcionando temperatura favorável para desenvolvimento da bactéria, *E. coli*, sendo esta plaqueada em meio de cultura, MacConkey acrescido de ampicilina 100mM (200ul por placa) e mantida em estufa a 37°C overnight.

No dia seguinte, colônias brancas foram selecionadas e adicionadas em meio LB líquido com ampicilina. Após cerca de 18 horas, a extração do DNA plasmidial foi realizada, utilizando o kit, QIAPrep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

Os vetores recombinantes foram posteriormente sequenciados para confirmação das bibliotecas genômicas. E finalmente, após confirmação da identidade viral dos fragmentos clonados através do sequenciamento das bibliotecas genômicas, o produto da PCR final foi destinado ao laboratório de Estudos avançados em Genômica, Proteômica e Bioinformática, visando o sequenciamento do genoma por SNG (plataforma Ion Torrent-Life Technologies) de patógenos virais desconhecidos provenientes da planta de Star Jasmine, Honolulu, Hawaii.

### 4.1.4. Análise dos dados gerados pela plataforma Ion Torrent®.

O programa Geneious® Pro 7.1.5 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) foi utilizado na análise dos dados obtidos na plataforma Ion Torrent, responsável por gerar inúmeras "contigs", que foram mapeadas para o genoma dos tombusvirus, analisadas pelo programa Blastx (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e agrupadas de acordo com região do genoma, CP e RdRp.

### 4.1.5. Obtenção de oligonucleotídeos a partir da sequencia montada ou "contigs"

Após a identificação das regiões pelo programa Blastx, as "contigs" foram utilizadas na obtenção de treze oligonucleotídeos para a detecção da CP e da RdRp (Tabela 1). Os pares de oligonucleotídeos visam amplificar longos fragmentos no genoma, auxiliando no mapeamento da região da CP e da RdRp obtidas pela análise das sequencias.

**Tabela 1.** Sequências dos treze oligonucleotídeos obtidos a partir das "contigs", para amplificação de regiões da CP e da RdRp.

| Oligonucleotídeos | Região do Genoma | Senso/ Anti-senso | Sequencia |
|---|---|---|---|
| SJ1 | RdRp | Senso | CYA AAT CCA CAT CTK CTG |
| SJ2 | RdRp | Senso | GTC GGK GCT AAT TTT ATC |
| SJ3 | CP | Anti-senso | CCG CAA TCG ACR AGT TT |
| SJ4 | CP | Anti-senso | RTT CCG KGG ACT RTA CC |
| SJ05 | RdRp | Senso | GTA TGG GTT CAC TTG TG |
| SJ06 | RdRp | Senso | GAG TGG TGA CAT GAATAC |
| SJ07 | RdRp | Senso | GTT TCT GTG GAT GCATTG |
| SJ08 | RdRp | Senso | GTC GAT CCCCGT AGGTTG |
| SJ09 | RdRp | Senso | CCT ACT TTC GCC GCAATC |
| SJ10 | CP | Anti-senso | GTT ACC TGA CAA TCT TAC |
| SJ11 | CP | Anti-senso | GAA CAA ATG AGGACAAGG |
| SJ12 | CP | Anti-senso | ACC CTT GTC CTC ATT TG |
| SJ13 | CP | Anti-senso | CTT GTC GAT TGC GGA GC |

Diferentes combinações de oligonucleotídeos, SJ05/ SJ3, SJ05/ SJ4, SJ06/SJ3, SJ06/SJ4, SJ1/SJ10, SJ1/SJ11, SJ1/SJ12, SJ1/SJ13, SJ2/SJ10 e SJ2/SJ11, foram testadas com cDNA, obtidos a partir do produto da síntese da reação de overlap-extension PCR. O ciclo da PCR consistiu de 5 minutos a 95 °C; 40 ciclos (90s/ 95°C, 90s/ 50°C e 90s/ 72°C) e 10 min a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram clonados e sequenciados pelo método tradicional, utilizando oligonucleotídeos T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG 3') (Promega) do Vetor PGem-T easy.

### 4.2. Detecção de vírus em plantas coletadas na ilha de Oahu utilizando oligonucleotídeos obtidos a partir das "contigs".

A seguir, trinta de duas amostras foliares sintomáticas de jasmim estrelado foram coletadas em diferentes regiões na ilha de Oahu, Pucks Alley, Aina Haina, Pearl City e Kahala (Tabela 2).

**Tabela 2**. Período, número de amostras e localidade de plantas de jasmim estrelado sintomáticas coletadas em fevereiro de 2015.

| Período da Coleta | N$^{o}$ de amostras coletadas | Localidade |
|---|---|---|
| Feb. 2015 | 10 | Pucks Alley |
| Feb. 2015 | 9 | Aina Haina |
| Feb. 2015 | 10 | Pearl City |
| Feb. 2015 | 3 | Kahala |
| **TOTAL** | **32** | |

### 4.2.1. Extração Total de Ácidos Nucléicos – Método CTAB adaptado, RT-PCR, clonagem e sequenciamento

As amostras foliares coletadas na ilha de Oahu foram submetidas a extração total de ácidos nucléicos pelo método CTAB adaptado, no qual 200 mg das amostras foram maceradas em tampão de extração (CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM), incubadas a 65 °C por 15 minutos, seguido de centrigugação a 10.000 g por 5 minutos. Posteriormente, 600 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado igual volume de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), sendo gentilmente agitado por alguns segundos. As amostras foram submetidas a centrifugação a 15.000 g por 15 minutos. e 500 µL do sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando igual volume de isopropanol., seguido de incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após, as amostras foram novamente centrifugadas a 15.000 g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e 1 ml da etanol 75% adicionado e gentilmente agitado. Finalmente. após nova centrifugação a 15.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o "pellet", após seco, ressuspendido em 50 µL de água livre de RNAse e DNAse, e em seguida, armazenado a -20 ou -80 °C .

Em seguida, a RT-PCR em uma só etapa foi realizada com o par de oligonucleotídeo SJ5/SJ3, utilizando o kit de PCR, GoTaq® Green Master Mix (Promega) e transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus), num volume final de 25 ul, sendo 12,5 uL de PCR master mix 2X, 100 mM de cada oligonucleotideo, 1 unidade de transcritase reversa AMV (Promega), 2,5 ul de RNA. O ciclo da RT-PCR consistiu de 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 95 °C; 40 ciclos (90s/ 95°C, 90s/ 50°C e 90s/ 72°C) e 10 min a 72°C.

A seguir, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, clonadas em PGEM- T easy e sequenciadas utilizando os oligonucleotídeos provenientes do vetor, SP6 (5'TATTTAGGTGACACTATAG 3') e T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG 3') (Promega).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração da dsRNA e a síntese de cDNA foi satisfatória, pois após a reação da overlap-extension PCR, foi possível observar em gel de agarose 1%, o "smear" proveniente das amostras (Figura 2), indicando a presença de inúmeros fragmentos de diversos tamanhos, amplificados em uma mesma reação.

Os fragmentos representados pelo "smear", produto da reação da overlap-extension PCR, foram clonados com êxito e apresentaram diferentes tamanhos (Figura 3), estando de acordo com a metodologia acima descrita (Item 4.1.2). Os fragmentos clonados e sequenciados mostraram similaridade com espécies virais pertencentes a família *Tombusviridae*, membros do gênero *Pelarspovirus*, tais como: *Rosa rugosa leaf distortion virus*, *Pelargonium ringspot virus*, *Pelargonium chlorotic ring pattern virus* e *Elderberry latent virus*.

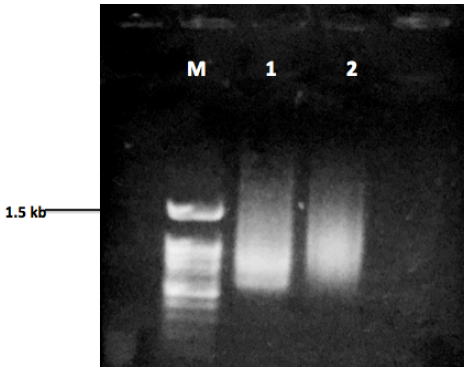



**Figura 2**. Gel de agarose a 1% com reação de overlap-extension PCR. (M) Marcador Molecular – 100 bp DNA ladder. (1 e 2) "Smear" do produto da reação de overlap-extension PCR, amostras provenientes de folhas de jasmim estrelado submetidas a extração dsRNA e síntese cDNA.

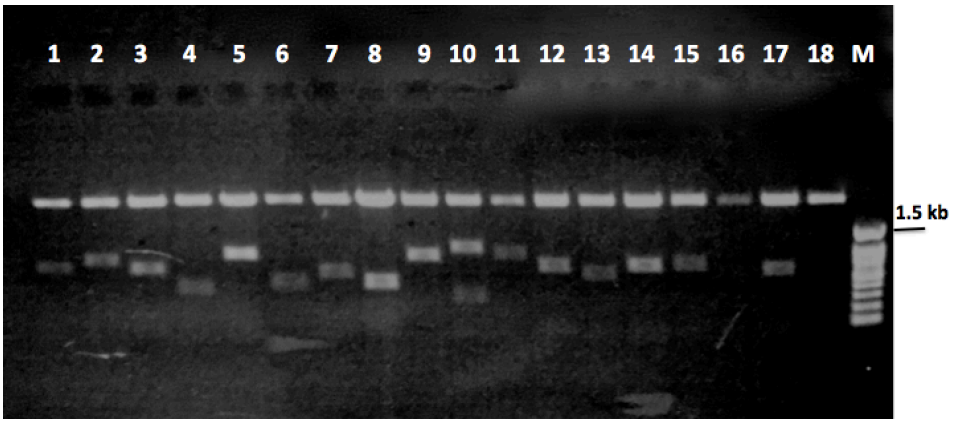



**Figura 3**. Gel de agarose a 1% com vetor pGem-T Easy + Fragmento cDNA clonado a partir da amplificação da amostra proveniente de jasmim estrelado, produto da reação de overlap-extension PCR, síntese de cDNA a partir de dsRNA. (M) Marcador Molecular – 100 bp DNA ladder. (1 a 18) pGEM-T easy + Fragmento cDNA clonado.

Assim como o sequenciamento tradicional dos fragmentos clonados e sequenciados, as análises dos dados gerados pela plataforma Ion Torrent resultante do SNG através das análises de identidade das "contigs" provenientes da CP e da RdRp, também constataram significativa similaridade com membros da família *Tombusviridae*, tais como *Rosa rugosa leaf distortion virus* (RrLDV), *Pelargonium ringspot virus* (PRSV), *Pelargonium chlorotic ring pattern virus* (PCRPV) e *Elderberry latent virus* (ELV).

Portanto, "contigs" obtidas a partir dos dados gerados pelo SNG foram mapeadas baseando-se no genoma dos tombusvirus. As "contigs" que mapeiam a

mesma região (CP ou RdRp) quando comparadas entre si apresentaram porcentagem de identidade de aminoácidos inferiores a 75%, critério de demarcação de nova espécie estabelecido por SCHEETS e colaboradores (2015) para o novo gênero *Pelarpovirus*. Esses resultados indicam provável presença de diferentes virus relacionados presentes na amostra. Sendo assim, as análises de identidade das sequencias auxiliam na determinação se esses vírus são estirpes do mesmo vírus ou representam espécies distintas.

O sequenciamento convencional e o sequenciamento de nova geração da biblioteca construída a partir da dsRNA, bem como as análises das sequencias das "contigs" sugerem a presença de múltiplos vírus relacionados, semelhantes aos membros da família *Tombusviridae*, prováveis novas espécies próximas ao gênero *Pelarspovirus*, sendo os prováveis agentes causais relacionados ao sintomas foliares exibidos pela planta.

Em relação aos testes com os oligonucleotídeos obtidos a partir de vinte e uma "contigs", foi possível constatar a presença de fragmentos amplificados. No entanto, até o momento foi confirmado a eficiência dos pares SJ05/ SJ3, SJ05/ SJ4, SJ06/SJ3 e SJ06/ SJ4, os quais permitiram a amplificação de fragmentos com de cerca de 1 a 1.2 kb. As amostras apresentaram similaridade muito próxima aos membros da família *Tombusviridae*, o RrLDV (ACD87737 e YP_007501034), PCRPV (YP_052925), PLPV (ACJ38444) disponíveis no GenBank (Tabela 3).

**Tabela 3** Porcentagem de similaridade dos fragmentos amplificados, clonadas e sequenciados.

| Amostra sequenciada | Vírus (Nº acesso GenBank) | % de similaridade | Vírus (Nº acesso GenBank) | % de similaridade | Região |
|---|---|---|---|---|---|
| 1SJ5/3 | RrLDV (ACD87737) | 59% | PCRPV (YP_052925) | 58% | RdRp |
| 2SJ5/3 | RrLDV (ACD87737) | 59% | PCRPV (YP_052925) | 58% | RdRp |
| 3SJ5/3 | RrLDV (YP_007501039) | 62% | PCRPV (YP_052929) PLPV (ACJ38444) | 59% | CP |
| 4SJ5/3 | RrLDV (YP_007501034) | 69% | PCRPV (YP_052925) | 68% | RdRp |
| 5SJ5/4 | RrLDV (ACD87737) | 59% | PLPV (AHZ59467) | 56% | RdRp |
| 6SJ5/4 | RrLDV (ACD87737) | 61% | PCRPV (YP_052929) | 56% | CP |
| 8SJ6/3 | RrLDV (YP_007501034) | 57% | PCRPV (YP_052929) | 56% | RdRp |
| 10SJ6/4 | RrLDV (YP_007501039) | 63% | PCRPV (YP_052929) | 59% | CP |

No que se refere as 32 amostras, coletadas na ilha de Oahu, para a detecção de vírus utilizando oligonucleotídeos obtidos a partir das "contigs", a combinação SJ5/SJ3 foi selecionada e utilizada na avaliação por RT-PCR, apenas 4 amostras mostraram-se positivas, sendo uma de cada região de coleta, Pucks Alley, Aina Haina, Pearl City e Kahala. É provável que o par de oligonucleotídeo selecionado para as análises das amostras coletadas na ilha, SJ5 e SJ3 seja capaz de amplificar parcialmente a região da CP e da RdRp de apenas um vírus, visto que a maioria das amostras foram negativas com esse par de oligonucleotídeo, não excluindo a possibilidade de outros vírus relacionados estarem presentes nas amostras foliares.

Após o término do período de doutorado sanduiche, o trabalho com os vírus presentes nas amostras foliares de jasmim estrelado teve continuidade e o genoma de dois vírus foram completamente sequenciados. Análises filogenéticas das sequências de aminoácidos provenientes da RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) e da capa proteica (CP) formaram um grupo filogenético próximo ao gênero *Pelaspovirus*. Para as duas novas espécies foi proposto o nome de Jasminium chlorotic mottle virus 1 e 2

(JCMV-1 e JCMV-2). Embora a maioria das plantas analisadas apresentem infecções mistas com ambos os vírus, a ausência do JCMV-2 em algumas plantas sintomáticas presume que o possível agente(s) causal é o JCMV-1

## 6. REFERÊNCIAS

BAR-JOSEPH, M., ROSNER, A., MOSCOVITZ, M., HULL, R. A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from virus-infected plants. **Journal Virology Methods**, v. 6: 1–8, 1983.

BURKILL H.M., "The Useful Plants of West Tropical Africa", The White Friars Press Ltd, London, 1985,1-30.

CASTANO, A., RUIZ, L., HERNANDEZ, C. Insights into the translational regulation of biologically active open reading frames of Pelargonium line pattern virus. **Virology**, v. 386, p. 417-426, 2009.

DODDS, J. A.; MORRIS, T. J.; JORDAN, R. L. Plant Viral Double-Stranded RNA. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22: 151-168, 1984.

GANATRA, S. H.; DURGE, S. P.; RAMTEKE, A. M. Phytochemicals investigation and tlc analysis of *Jasminum multiflorum* leaves. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 4, n.3, p.1135-1139, 2013.

HEGNAER R., "Cultivation and Utilization of Aromatic Plants, Regional Research Laboratory, CSIR, Jammu- Tawi., 1-22, 1982.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS. ICTV Virus Taxonomy. Disponível em: < http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp >. Acesso em: 18 set. 2016.

KAMENOVA, I., ADKINS, S. and ACHOR, D. Identification of *Tomato mosaic virus infection* in jasmine. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 722, p. 277-284, 2006. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.722.34. http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.722.34

MAMILLIAN H.F.; "Tropical Planting and Gardening", Macmillan Co. Ltd. London, 2-20, 1954.

MORRIS, T. J.; DODDS, J. A. Isolation and Analysis Double-Stranded RNA (dsRNA) from Virus-Infected Plant and Fungal tissue. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, p. 854-858, 1979.

OGUNDIPE O., AKINBIYI O., and MOODY J.O., "Antimicrobial Activities of Selected Ornamental Plants" Nig.J. Nat.Prod. and Med., Vol 2, 1998.

SCHEETS, K.; JORDAN, R.; WHITE, K. A.; HERNÁNDES, C. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. **Archieves of Virology**, Vienna, v. 160, p. 2385–2393, 2015.

SUJITHA, S.; BHASKARA REDDY, B. V.; SIVAPRASAD, Y.; USHA, R.; KRISHNA, T. G.; GOPAL, D. V. R. S. First Report of *Groundnut bud necrosis virus* in jasmine. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 95, n. 3, p. 659-668, 2013.

## 5. CONCLUSÕES

- A incidência de tospovirus em plantas de alface coletadas em regiões produtoras do Estado de São Paulo prevaleceu no ano de 2014 e 2015;
- As 832 sementes provenientes de plantas de alface cv. Trocadero infectadas pelo LeMoV não apresentaram sintomas;
- *M. persicae* e *A. gossypii* não transmitiram o LeMoV de planta infectada para sadia;
- Domínios conservados típicos na região da CP, HEL e da POL, característicos dos picornavirales estão presentes na poliproteina do LeMoV;
- Análises filogenéticas do genoma do LeMoV mostraram que essa espécie está mais próxima filogeneticamente dos membros do gênero *Sequivirus;*
- Plantas de jasmim estrelado coletadas na ilha de Oahu, na cidade de Honolulu, Hawaii, nos Estados Unidos estão infectadas com múltiplos *tombus*virus.

# APÊNDICES

# Apêndice 1



APS Homepage
Back




**Poster Session: Diseases of Plants - New and Emerging Diseases**

**564-P**

**Star jasmine (*Jasminum multiflorum*) plants in Hawaii are infected with multiple tombusviruses.**

M. Leite de Oliviera (1), W. Borth (2), J. Carrillo (3), J. Hu (2), K. Neupane (3), S. Stubblefield (3), M. MELZER (2)
(1) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil; (2) Univ of Hawaii At Manoa, Honolulu, HI, U.S.A.; (3) Leeward Community College, Pearl City, HI, U.S.A.

Star jasmine (*Jasminum multiflorum*) is a shrub with fragrant flowers commonly grown in Hawaii as a hedgerow or landscape accent plant. On the island of Oahu, Hawaii, star jasmine plants express a diverse array of virus-like foliar symptoms including ringspots, line patterns, mosaic, mottling, and leaf deformation, often on the same plant. To investigate a possible viral etiology, symptomatic tissue underwent double-stranded RNA (dsRNA) isolation, library construction, and sequencing. DsRNAs of approximately 4.2 and 1.6 kbp were consistently isolated from symptomatic leaf tissues collected from three locations on Oahu. Conventional and high-throughput sequencing of a library constructed from these dsRNAs revealed the presence of several related viruses most similar to putative members of the family Tombusviridae: Rosa rugosa leaf distortion virus, Pelargonium ringspot virus, Pelargonium chlorotic ring pattern virus, and Elderberry latent virus. Reverse transcription PCR-based assays revealed these viruses are widely distributed on Oahu and are the presumptive causal agent(s) of these symptoms.

© 2015 by The American Phytopathological Society. All rights reserved.

**Apêndice 2**: Sequência parcial da poliproteina do LeMoV, contendo os aminoácidos conservados sublinhados, domínios da Helicase (amarelo) e domínios da Polimerase (Cinza).

```
1               ATGATGTCAGCAATCCAACTCAGATTGCTATCAATGCTGCAAGAGGCGAGTACCAAGCTA
1                  D  V  S  N  P  T  Q  I  A  I  N  A  A  R  G  E  Y  Q  A

61              TTGAGGAATTTGCTTTCAGTGCCTACAACTTTGTTGACGTTGCTGAGATGGAAGAAACTA
20              I  E  E  F  A  F  S  A  Y  N  F  V  D  V  A  E  M  E  E  T

121             GCGGGAACGCAACCAAAACTCTTACAAACACTATCAAGCGGCGTGCTGCAGCCATGCTAG
40              S  G  N  A  T  K  T  L  T  N  T  I  K  R  R  A  A  A  M  L

181             GAGTCTCAAGGGCGTTCAAAGAGACAGAACAGGTCCTCTCAGTGGAACGTTGCAGGGTCA
60              G  V  S  R  A  F  K  E  T  E  Q  V  L  S  V  E  R  C  R  V

241             AAGAGATCTCCGAACATGAGGAGATCATAGCAACTACATTTGAACCACTGCGAGACATGA
80              K  E  I  S  E  H  E  E  I  I  A  T  T  F  E  P  L  R  D  M

301             AAACACCATCTAGGACTACCCAAGGAAAAGATGATCCCACGCTGGGGAAGCACAGAGCCA
100             K  T  P  S  R  T  T  Q  G  K  D  D  P  T  L  G  K  H  R  A

361             AGTACAACTACATGGCTATAGATTCGATGCGTGTGAGTATATCATCTTTGCTCCACCAAG
120             K  Y  N  Y  M  A  I  D  S  M  R  V  S  I  S  S  L  L  H  Q

421             GCGATGAAAGAGAGTGCATCATGTACGTGTGCGATAGGCGAATTTCTGATCCATTCCTAG
140             G  D  E  R  E  C  I  M  Y  V  C  D  R  R  I  S  D  P  F  L

481             GTGCGCTGGCTCTAATAGGTTTCCCTCTGAAGGGAATGTCTACCCATGTCTACAAAACTG
160             G  A  L  A  L  I  G  F  P  L  K  G  M  S  T  H  V  Y  K  T

541             GTCGCATTGTATGCTTCTCCAAGCATGAAGCCATCGCGCCTGAGCATATTCAACTCTACG
180             G  R  I  V  C  F  S  K  H  E  A  I  A  P  E  H  I  Q  L  Y

601             TCTACATCAAAGGCGCAAAGCTGCTCAGGAAAGACAACGCCCCTTTTGCTCTCAACATGA
200             V  Y  I  K  G  A  K  L  L  R  K  D  N  A  P  F  A  L  N  M

661             AGACCAGTTTCATTTTTGGAAACAATGCTGAAAATTTGCTCAAACACGACACCACCATGG
220             K  T  S  F  I  F  G  N  N  A  E  N  L  L  K  H  D  T  T  M

721             ACACAGACGGCAACCTAATCTCTTTTCTTACACAGAATCAAGATATCTTCGGATGGCTCG
240             D  T  D  G  N  L  I  S  F  L  T  Q  N  Q  D  I  F  G  W  L

781             AGACGGCCCAGGGTGGAGGTTACACCCCCCTCAGGAGGCAGGAAGGTTGCTCTTCACATT
260             E  T  A  Q  G  G  G  Y  T  P  L  R  R  Q  E  G  C  S  S  H

841             CCAACCGCAGTTCCTTGATGAAGGCGTGGGCAACGCCCAAAGGAAACATTTCCCAAAGAT
280             S  N  R  S  S  L  M  K  A  W  A  T  P  K  G  N  I  S  Q  R

901             TCTCTGGCTCTATGATTCCCCGAAGTGTGCAGCCAAATGAGGAGGGCGCGGATGTGCATG
300             F  S  G  S  M  I  P  R  S  V  Q  P  N  E  E  G  A  D  V  H

961             GGGCCACACTGCATGTTGGTAATTCGAGAGATGACCTGGGAAGACTCAACATAGGTGTGT
320             G  A  T  L  H  V  G  N  S  R  D  D  L  G  R  L  N  I  G  V

1021            CACGAGCAGGCGTCAGTTCGACAGATATGGATGAAAGGCTCCACTCTGTGGTAGATTTCG
340             S  R  A  G  V  S  S  T  D  M  D  E  R  L  H  S  V  V  D  F

1081            TGCAAGACTCTGAGATACAACCAATAACTGCCAACTTGGAAGCTTTTATGTCAGAGCCAA
360             V  Q  D  S  E  I  Q  P  I  T  A  N  L  E  A  F  M  S  E  P

1141            ATGTGGCAGCTTCGGTGGAAACGTTCGAGAGGCAGTTCACCCGTCCCATCTATGTGAACA
380             N  V  A  A  S  V  E  T  F  E  R  Q  F  T  R  P  I  Y  V  N
```

```
1201            CGATAGAGTGGAAATCAACACACGATGTGGGGGCGGAAGTTTTCGCACTGGAAAATCCAG
400             T  I  E  W  K  S  T  H  D  V  G  A  E  V  F  A  L  E  N  P

1261            GGGACTTTATGGGAACTCCCTCTCTATTTGGGCAATTCGTCAAAAGAGCTTTTTGCTTTA
420             G  D  F  M  G  T  P  S  L  F  G  Q  F  V  K  R  A  F  C  F

1321            AAGCCGATTTTGAGGTGAACATCATGATTAGCGGAAACGAAGCTTTCAGCGGCGCTATTA
440             K  A  D  F  E  V  N  I  M  I  S  G  N  E  A  F  S  G  A  I

1381            AGGTGTGCGTTGATCATATGAGGCGTCTTTATGAAGCTGGGCGAGACGACGTGCAGGTTT
460             K  V  C  V  D  H  M  R  R  L  Y  E  A  G  R  D  D  V  Q  V

1441            TCCAATCCATGCCAGGGGAGACACTTCATGCTAGCGACACTAACGGTTTGAAATTTTCAT
480             F  Q  S  M  P  G  E  T  L  H  A  S  D  T  N  G  L  K  F  S

1501            TGCCATTTGAGTCTATTCACAACATGATCTCAGCCCACGATCTTGGCTCGCACAACGCCC
500             L  P  F  E  S  I  H  N  M  I  S  A  H  D  L  G  S  H  N  A

1561            TGAGCAGAGTCTCCCTTAGAGTCATCGCCAAGTTGGCACACGCCCAGCAAACGGCACCCA
520             L  S  R  V  S  L  R  V  I  A  K  L  A  H  A  Q  Q  T  A  P

1621            CCATGCATATGACGATCCAGGTTTACGTGAAAAATCTTAGTGCTAAGCATGCGATGTGGA
540             T  M  H  M  T  I  Q  V  Y  V  K  N  L  S  A  K  H  A  M  W

1681            AATCCCTTGAGACCACTTTCCCAGTATCCCAGGGAACCCCTCTACCTTCTGTGGTTGGAA
560             K  S  L  E  T  T  F  P  V  S  Q  G  T  P  L  P  S  V  V  G

1741            ACCGGTATGGCAGCCTAAACACCAGCTCCAATTCTATGGGCCCCGCAGAAATCAGGAGCA
580             N  R  Y  G  S  L  N  T  S  S  N  S  M  G  P  A  E  I  R  S

1801            TAGTGACGCAAAAGGCTTTGATAGGCACGGCGACTATATCGAGCGAAACCAAATTGAGAA
600             I  V  T  Q  K  A  L  I  G  T  A  T  I  S  S  E  T  K  L  R

1861            TCATTGTGGCAACTTTTGCCATACATCCCATGAGCAGCAGAACAGAATCTGGTATTCTCA
620             I  I  V  A  T  F  A  I  H  P  M  S  S  R  T  E  S  G  I  L

1921            AACTGAGTCAGCTAGCAGCTTTAAGCGCCATGTTTTCGTATTGGAGAGGGTCTCTGATCG
640             K  L  S  Q  L  A  A  L  S  A  M  F  S  Y  W  R  G  S  L  I

1981            TCCATTTTGAAATGACATGTTCCTCCGCCACCAGGGGCAAGGTGCTCTTTAGCATCACTC
660             V  H  F  E  M  T  C  S  S  A  T  R  G  K  V  L  F  S  I  T

2041            CAAAGGGGGGCGCCGAGATGAAAAGGCGCGCAGGCCTCCACCTCGGCATGGGAGCAGAAT
680             P  K  G  G  A  E  M  K  R  R  A  G  L  H  L  G  M  G  A  E

2101            TCGATATAGGCACAGCCATTTCCAGGAAATTTGAGATACCGTTTGTTTCAACCGATGACT
700             F  D  I  G  T  A  I  S  R  K  F  E  I  P  F  V  S  T  D  D

2161            GGGAATCACTTGGGGACAGAGGACTGATGAGCGCTTTTGAAGGCATATGGGATTGTCCCG
720             W  E  S  L  G  D  R  G  L  M  S  A  F  E  G  I  W  D  C  P

2221            TAGCCAAGATTATAGTGCTTCATCCTATTAACAGCATAGGGGCAACCACTCCTTCAGTGG
740             V  A  K  I  I  V  L  H  P  I  N  S  I  G  A  T  T  P  S  V

2281            ATATCAGGTGTTACATCTCCCCTGGACGAGATTTCGAGTTGAGGGGAAGACGCCACCTCG
760             D  I  R  C  Y  I  S  P  G  R  D  F  E  L  R  G  R  R  H  L

2341            GCTTGCGCACAAGTCTTCGACCCCTAAGTTTGGGAACGGCTCAAAACAGACACCTCCAAG
780             G  L  R  T  S  L  R  P  L  S  L  G  T  A  Q  N  R  H  L  Q

2401            AGGGCTCTTCATTCACGCTAATGGGTGCCATGGAGGTGAACAGCATAGAATCGTCCTGTA
800             E  G  S  S  F  T  L  M  G  A  M  E  V  N  S  I  E  S  S  C

2461            TAATTCAGATCCCTTGTGCCCCCTGGTATTCAAAAGATTCCATCGATTATGCTCTCTTGC
820             I  I  Q  I  P  C  A  P  W  Y  S  K  D  S  I  D  Y  A  L  L

2521            AAAATCCCCTCCATTGGGCCTCAAGGTTTTTCACTTTCTGGAAGGGAGATCTTTCGTTCA
840             Q  N  P  L  H  W  A  S  R  F  F  T  F  W  K  G  D  L  S  F
```

```
2581            GAATAGTGATTAAAGAAGGAGATGAATTAGGACCAAACTGGCAAGCTCCCATCACCATGT
860             R  I  V  I  K  E  G  D  E  L  G  P  N  W  Q  A  P  I  T  M

2641            GGCACAACTCACAGGCCACGTTTGACAAATGCAAGATATCAAAGGTGGAAGGGAAAACTC
880             W  H  N  S  Q  A  T  F  D  K  C  K  I  S  K  V  E  G  K  T

2701            TCTCGAAGGAAGGATATCCCTCGGAAAAATTGTCGCTAAAACAGATGAACACGATGGAAA
900             L  S  K  E  G  Y  P  S  E  K  L  S  L  K  Q  M  N  T  M  E

2761            TCACAGCTCATGATGATCAGCGCTACAGGTGGAGGCTCTGCAAGCTCCATGATACCCAAG
920             I  T  A  H  D  D  Q  R  Y  R  W  R  L  C  K  L  H  D  T  Q

2821            ACTCGGCTCTGGAGGGTAGCTCGACGAAATATACGGGACACCCACCACTATCGTCCCACA
940             D  S  A  L  E  G  S  S  T  K  Y  T  G  H  P  P  L  S  S  H

2881            CAGGAGTGGTGTTCGTGAAATTTCCAAAAGGAGGCTTTAAGGCGAAAGTCAAGATCTACA
960             T  G  V  V  F  V  K  F  P  K  G  G  F  K  A  K  V  K  I  Y

2941            GCAAGCCAGAAGCGAATTTTCAATACCATCTCAGTGGAGGGGTGCCATCTCTGAAACTAG
980             S  K  P  E  A  N  F  Q  Y  H  L  S  G  G  V  P  S  L  K  L

3001            ACAAGCTACGCCCATACTCGTCGCCTTTCTATCCCAACGGTAAACCGTCGGTGTTGGGAC
1000            D  K  L  R  P  Y  S  S  P  F  Y  P  N  G  K  P  S  V  L  G

3061            ATAATTCGCAGCTCCTGGTGGGGAGAGCACAAGCATCACTCAGTCTCCCTTCCTTCATCA
1020            H  N  S  Q  L  L  V  G  R  A  Q  A  S  L  S  L  P  S  F  I

3121            CTCAGCGCTACACACACTCAGCTCCGCCCACACTGGATAATCCTAGCAGCACCTCCTCCT
1040            T  Q  R  Y  T  H  S  A  P  P  T  L  D  N  P  S  S  T  S  S

3181            CAACCGCCGAACCTGAGGCGGAAACTCTTGTGGAAACTTCAAAGCGCAAACTTGGCGAGC
1060            S  T  A  E  P  E  A  E  T  L  V  E  T  S  K  R  K  L  G  E

3241            TGTTTTCAATAGTTGGAGCGAAAATCAAAGAGGCATTGTCGTCGTTGTTCCTAAGCGTTT
1080            L  F  S  I  V  G  A  K  I  K  E  A  L  S  S  L  F  L  S  V

3301            CGAAGAGTGTTGTGTGCTCTCTAATATCCTCAATGATTGACAAAGCGCTCTCCATATTCA
1100            S  K  S  V  V  C  S  L  I  S  S  M  I  D  K  A  L  S  I  F

3361            GTGATGTGTTCTCCAAGATAGCAGCAACATTCAAGGACATGTTAGCAACGCCAATCACCA
1120            S  D  V  F  S  K  I  A  A  T  F  K  D  M  L  A  T  P  I  T

3421            GTTTGATCCTAGGACTGTCTTTCACAGCCATTGCCTGCTATTCGGCCCTCAAATTCGCCT
1140            S  L  I  L  G  L  S  F  T  A  I  A  C  Y  S  A  L  K  F  A

3481            CCGCCACGGTGCCAGATTCCATGGGCCACTTCAAGACTCTCATCACAGCTGTTAGTGTCG
1160            S  A  T  V  P  D  S  M  G  H  F  K  T  L  I  T  A  V  S  V

3541            CTTTGAGTGTCATATATTGGCCAACGGCTCTAAGCACAATATTGATGAACCTGGAGAAGC
1180            A  L  S  V  I  Y  W  P  T  A  L  S  T  I  L  M  N  L  E  K

3601            TGTTTGAGACTATCGAAGAGAGTTGCCACGCAGTGCACGAGTATTTCTTTCCCAATTCAG
1200            L  F  E  T  I  E  E  S  C  H  A  V  H  E  Y  F  F  P  N  S

3661            TTACCAACCAGCCCTCATCGTCAGATTACCCCGCGACCTCATGTACTACAAGCGGTGTGA
1220            V  T  N  Q  P  S  S  S  D  Y  P  A  T  S  C  T  T  S  G  V

3721            ACCCTGATGAATTGAGAGATGGTAAAGCACAAGGAGCGAGTGATTGCGTCATTGGCCTCG
1240            N  P  D  E  L  R  D  G  K  A  Q  G  A  S  D  C  V  I  G  L

3781            TGGGCTTGGCAGCATACATCAGATTGTGTGTGACAATATGCAACTCTCTTGGCGAGAACT
1260            V  G  L  A  A  Y  I  R  L  C  V  T  I  C  N  S  L  G  E  N

3841            ACATGGATCCCTTCCTTCCCAAGAATATGGAGAAGAGCCTCAGGAGCGTGAGTGGTATAA
1280            Y  M  D  P  F  L  P  K  N  M  E  K  S  L  R  S  V  S  G  I

3901            GCCAAGGAATTAAGACCCTGGTTGACTTCAAGGACTATCTATATAGAGTCATCATGGGCA
1300            S  Q  G  I  K  T  L  V  D  F  K  D  Y  L  Y  R  V  I  M  G
```

```
3961          ATCTCATGCCAACCAGTTCCTACACTGCGGTTTCGAAAGAGGTGGGCTTTGACCTGAAGG
1320          N  L  M  P  T  S  S  Y  T  A  V  S  K  E  V  G  F  D  L  K

4021          AATGGTTTGAGGACGTTGAACGGCTAACGCTTCACGAGAACAGGTATCATGATCTGAACA
1340          E  W  F  E  D  V  E  R  L  T  L  H  E  N  R  Y  H  D  L  N

4081          ACGAGCACAAAATATGGGAAATTCGCCAGGCCTATAGCAAGGGAGTGATTGTTATGGGAG
1360          N  E  H  K  I  W  E  I  R  Q  A  Y  S  K  G  V  I  V  M  G

4141          TCCTCTCAAGAGTTGAAATGGTTCACCTTGCTAGAATGTGTGAGCGCACTTTCAAGCTTG
1380          V  L  S  R  V  E  M  V  H  L  A  R  M  C  E  R  T  F  K  L

4201          CAAAAGAGCTTCTTGATGAAACACACAGAGTTAAGGGCGTTAGCGGAGTTAGACTGGATC
1400          A  K  E  L  L  D  E  T  H  R  V  K  G  V  S  G  V  R  L  D

4261          CCTTTCACCTCTCCCTTTTTGGATCGCCGGGAGTTGGCAAATCTTTCGTGATGGGGAGAT
1420          P  F  H  L  S  L  F  G  S  P  G  V  G  K  S  F  V  M  G  R

4321          TGTTAGAGGACACCTTAGATTTAATGGGAGAGCCCATGGCTGACAGATCGTATTCGAAGA
1440          L  L  E  D  T  L  D  L  M  G  E  P  M  A  D  R  S  Y  S  K

4381          CCCCGAATGAAGAGTATTGGAGTGGTTACTACGGACAAACAGCGGTCAAATGCGATGATC
1460          T  P  N  E  E  Y  W  S  G  Y  Y  G  Q  T  A  V  K  C  D  D

4441          TTGGTCAAGACTTGAGCAAGGGTTTCTCCCCCACCTACAATCAAATCATCCAGATGAAGA
1480          L  G  Q  D  L  S  K  G  F  S  P  T  Y  N  Q  I  I  Q  M  K

4501          CCAACAATCCTTTCATTGTGCCTATGGCCGATCTAGCAAATAAAGGAAGAACTTTCACGA
1500          T  N  N  P  F  I  V  P  M  A  D  L  A  N  K  G  R  T  F  T

4561          GCAAGTACATCTTTTCCACCACCAACGTGAGAGACTGTGGAAGCAAGCATGGATTGGCAG
1520          S  K  Y  I  F  S  T  T  N  V  R  D  C  G  S  K  H  G  L  A

4621          ACCCTGATGCCTTCTTGAGGAGAAGAGACCTGTTGGTTCACGTCACCACAGAAGGGCCTC
1540          D  P  D  A  F  L  R  R  R  D  L  L  V  H  V  T  T  E  G  P

4681          TGATTCACGGCCAGGTAAATCACATGAGATTCACTATTCTTGACCCCCTGAACCCGAACG
1560          L  I  H  G  Q  V  N  H  M  R  F  T  I  L  D  P  L  N  P  N

4741          AGCGCGACACTAGATTTCCCGAGAATATGATCTATGCTGACTTCCTTTGCTTGTGCATAT
1580          E  R  D  T  R  F  P  E  N  M  I  Y  A  D  F  L  C  L  C  I

4801          TTGAGATGACGCAGTACTTCAGGAAGCAAGAAAAGGTTCTTGAGACGCTCCGAGGAAAGT
1600          F  E  M  T  Q  Y  F  R  K  Q  E  K  V  L  E  T  L  R  G  K

4861          ATTGGGCTCGATGCACACCAC-TCGTGAGATTCGAAGCGTTCTAGAGTTGCTAGATCCCT
1620          S  L  G  S  M  H  T  T  R  E  I  R  S  V  L  E  L  L  D  P

4921          GAGCTTGAGAGAAAGGTTAGAGAGGTCATGGAGGAAAGCTACGTGGACGCTACAGATGAA
1640          E  L  E  R  K  V  R  E  V  M  E  E  S  Y  V  D  A  T  D  E

4981          CCCCTAGTTGATGAAAGGATGGAAGTAACTAGAGAGGACATTGAAAGGGGACTGGAACCT
1660          P  L  V  D  E  R  M  E  V  T  R  E  D  I  E  R  G  L  E  P

5041          GGGCGAGCGCAAGCCAACTCCTTTAGCTCATATCAGAACGACTTTGATGGCAACCCTCTT
1680          G  R  A  Q  A  N  S  F  S  S  Y  Q  N  D  F  D  G  N  P  L

5101          CCAAAACCTTTCTGCAAACTGTTTGCCAAGTACAGAGCGGGCTTTGCCAAAGATAAGAAG
1700          P  K  P  F  C  K  L  F  A  K  Y  R  A  G  F  A  K  D  K  K

5161          AAAGTTCTCACAGATTTAGAAATTGACGAGTTCGGTGCTTTCCTTTCCATGGGAGATTTT
1720          K  V  L  T  D  L  E  I  D  E  F  G  A  F  L  S  M  G  D  F

5221          GTGAGCCTGAATCCTGGGAGACTTGATTCAAATCTTGTGGGGCTTGCCAAACCCATACAC
1740          V  S  L  N  P  G  R  L  D  S  N  L  V  G  L  A  K  P  I  H

5281          AGGGAATTCTTTGACTATATCTTCCACGAGAGGCTGTTGTTTGTTGCCAAAGAGGATTTT
1760          R  E  F  F  D  Y  I  F  H  E  R  L  L  F  V  A  K  E  D  F
```

```
5341          CTCTATCCTTTCACCATGACGACTGCGGCAATGATCAACAGGCTAGTGCACGCCACACGT
1780          L  Y  P  F  T  M  T  T  A  A  M  I  N  R  L  V  H  A  T  R

5401          TATGAAATTGTCGATGGAAACGAGGTGATGAAACTGGAAGATGAATATGACAGAATGGCA
1800          Y  E  I  V  D  G  N  E  V  M  K  L  E  D  E  Y  D  R  M  A

5461          TATCAATCCCTGTCCATTCCCGAAAAGACAGCGTACCATTTGATGCTGGCGTGCATAAGG
1820          Y  Q  S  L  S  I  P  E  K  T  A  Y  H  L  M  L  A  C  I  R

5521          GCAAAGACTCTCAAGAGTGCAGGCTGGAGAACGTCTCTCTCCACGTGGTTTGAGTGGGTG
1840          A  K  T  L  K  S  A  G  W  R  T  S  L  S  T  W  F  E  W  V

5581          AAGCAAACGTGCGCAAATATTATCGATAGCCTTGCACCCACTGTTAAATTCCTTATCATG
1860          K  Q  T  C  A  N  I  I  D  S  L  A  P  T  V  K  F  L  I  M

5641          CTGGCCACCTCCTGTGGCGCTATGTTTTTAGCTTTCAAAGGGGTGCAAGGTGTAGTAGGC
1880          L  A  T  S  C  G  A  M  F  L  A  F  K  G  V  Q  G  V  V  G

5701          GCTATCAAGTTCGCTTTTGGTAACCCGCCATCGGACGAGGATTACATACAGATGAGCCTT
1900          A  I  K  F  A  F  G  N  P  P  S  D  E  D  Y  I  Q  M  S  L

5761          GATTCATTGACAGCTCTTGGGAGGAAAGGAAAAGGAAAGCAGCGCCCATCCTTTGGATCA
1920          D  S  L  T  A  L  G  R  K  G  K  G  K  Q  R  P  S  F  G  S

5821          GGGGATGAACTGACAGCGCGCATCGAGAGGATGATATCCCGCTCTGCATTGGCCACAGGA
1940          G  D  E  L  T  A  R  I  E  R  M  I  S  R  S  A  L  A  T  G

5881          GTTTCGCAAGGAGGCAGAACGCGATATGAAACCCAAAACCTTCTGTTGCAGCGTATGGGT
1960          V  S  Q  G  G  R  T  R  Y  E  T  Q  N  L  L  L  Q  R  M  G

5941          CATCTGCGCAATGAGGAGACGGGTGTGTCTTTGGTGGCTATCAACATTGGAAATGGATGT
1980          H  L  R  N  E  E  T  G  V  S  L  V  A  I  N  I  G  N  G  C

6001          ATCCTAACGCCGCTTCACGTGTTCCAAATGGCTGAAGAGGACGACATGTTAGTTTTCAGT
2000          I  L  T  P  L  H  V  F  Q  M  A  E  E  D  D  M  L  V  F  S

6061          TGGCAAGGGGAAAAATTCTTCTTCGTCTTTACCAAGGATAAAGTGACGCAAGTTGGAGAG
2020          W  Q  G  E  K  F  F  F  V  F  T  K  D  K  V  T  Q  V  G  E

6121          CTTGACCTATGCGTGATCAACACGCATTCAGTGCCCAAAAGAGATATGGTTTTGTCAATT
2040          L  D  L  C  V  I  N  T  H  S  V  P  K  R  D  M  V  L  S  I

6181          TTCATGGATGAGAAGGAGTTGGAAGCTTTTTCCGATATTAAGTGCTCATATGTTTGTGGT
2060          F  M  D  E  K  E  L  E  A  F  S  D  I  K  C  S  Y  V  C  G

6241          CCTTATCTAGGAGAAGCGGGTGCTCATGTTGAGGACGATCTGGTTGCCATTAGAGCCAAG
2080          P  Y  L  G  E  A  G  A  H  V  E  D  D  L  V  A  I  R  A  K

6301          CAATTTAAGTACACAGTTGGATCGCAAATGTTTATCAGCGTCCAGGGATGGGCTGTTGCA
2100          Q  F  K  Y  T  V  G  S  Q  M  F  I  S  V  Q  G  W  A  V  A

6361          CACACAACGCTAGAGGGTCAGTGTGGAAGCGTTCTAGTCTCCCACGATGAGGCTGTCAAT
2120          H  T  T  L  E  G  Q  C  G  S  V  L  V  S  H  D  E  A  V  N

6421          GGGAAGGTTTTTGGCATGTTGGTTGCAGGAACAACCGATCACAAAGGAAATAAAGTCGGA
2140          G  K  V  F  G  M  L  V  A  G  T  T  D  H  K  G  N  K  V  G

6481          ACGTATGTGCCAGTGACCAAGCAGATGATTATAAGAGCTCTGGGGAAAACTTGTGAGTTG
2160          T  Y  V  P  V  T  K  Q  M  I  I  R  A  L  G  K  T  C  E  L

6541          AAACAAGGAGCAGCTACTTCTTCTGTCTGCGGCGTGCACATAGACCCTGATCTCAACGTC
2180          K  Q  G  A  A  T  S  S  V  C  G  V  H  I  D  P  D  L  N  V

6601          GCATTGGGACTTGGGGAGAAGCTCACCTCCGAAGCTGTAGATGGAAGGCTAGGAATATTC
2200          A  L  G  L  G  E  K  L  T  S  E  A  V  D  G  R  L  G  I  F

6661          GCTGAAGGCACTCAATTTGGAGCAATTCACGTGGTTGGAAGAACAAAACCCGCTGCAAGT
2220          A  E  G  T  Q  F  G  A  I  H  V  V  G  R  T  K  P  A  A  S
```

```
6721        GTCAGAACGGCCACCAAGACCTCCATTGTCCCGAGCTTGATTCAACACACGCTACCGCGT
2240        V  R  T  A  T  K  T  S  I  V  P  S  L  I  Q  H  T  L  P  R

6781        GCCCCTCTAACTGAGCCTGCGATTCTGAGCGCTGAGGATCCCCGTCTAGAAGGGAAGTTG
2260        A  P  L  T  E  P  A  I  L  S  A  E  D  P  R  L  E  G  K  L

6841        TTTGACCCCCTGATTGATGGTATCAAGAAATATGAACACCAGGCCAAACCTTTCAGGGAA
2280        F  D  P  L  I  D  G  I  K  K  Y  E  H  Q  A  K  P  F  R  E

6901        GAATGGAGAAGGAAGATTCTCGACACCTTCAGCGAGGAGATGGAAGAGTGGGAAACCCAG
2300        E  W  R  R  K  I  L  D  T  F  S  E  E  M  E  E  W  E  T  Q

6961        ATGGTGAGGGTCAATTTTCAGAATAAAGAACCCACGCTCGACGAGATTATCAACGGGATA
2320        M  V  R  V  N  F  Q  N  K  E  P  T  L  D  E  I  I  N  G  I

7021        GATGGTGCTGAGTATTATGAGAGCATTAACATGAGCACTAGTGAGGGGTATCCCTTGATT
2340        D  G  A  E  Y  Y  E  S  I  N  M  S  T  S  E  G  Y  P  L  I

7081        CTGAAGAGACCCTCAGATGCGGATGGAAAGAAGTGGTTGTTTGACTTTGATGAGAGCACG
2360        L  K  R  P  S  D  A  D  G  K  K  W  L  F  D  F  D  E  S  T

7141        GGGAAATATCGCATGGCCAATGCAGATCTTATCAGAAACTATGAGGCTTATGGCGCTGCG
2380        G  K  Y  R  M  A  N  A  D  L  I  R  N  Y  E  A  Y  G  A  A

7201        CTATCCAAATTGCACCCAATCCCTTTGATCTGCATCGAGAGTCCCAAAGATGAAAGAAGA
2400        L  S  K  L  H  P  I  P  L  I  C  I  E  S  P  K  D  E  R  R

7261        GCCTTGAAAAAGATATACACAGAACCCAAAACTAGGCTTTTCTCCATATTGCCTGTGGAG
2420        A  L  K  K  I  Y  T  E  P  K  T  R  L  F  S  I  L  P  V  E

7321        TTCAACATGCATGCCAGACGGCTCTATCTTGATTTTAATGTGGTAACCATGGCGAACAGA
2440        F  N  M  H  A  R  R  L  Y  L  D  F  N  V  V  T  M  A  N  R

7381        CACAAGCATGGTATAATGGTTGGCATAAACCCCCACTCTCGCGAATGGACAGAGCTGGCT
2460        H  K  H  G  I  M  V  G  I  N  P  H  S  R  E  W  T  E  L  A

7441        CTAGGACTTGCATCCTTCTCACCGATAGGATTCAATGGCGATTTTGCGAACTTTGATGGC
2480        L  G  L  A  S  F  S  P  I  G  F  N  G  D  F  A  N  F  D  G

7501        ATGTTTCACCCCGATGCTTTCGACATGGTGTGCGATCTAGCTAACAAATTCTATGGCGAC
2500        M  F  H  P  D  A  F  D  M  V  C  D  L  A  N  K  F  Y  G  D

7561        AGCAGAGGGGCCGAGCGAAAATGTCTCACTGAAGCCCTCACCAACAGACTATCCCTCGTC
2520        S  R  G  A  E  R  K  C  L  T  E  A  L  T  N  R  L  S  L  V

7621        AAAGGTTCCGTTCTAAGCATTGGAGGAGGGGGCCCCTCAGGATTTCCCATGACTGTGATC
2540        K  G  S  V  L  S  I  G  G  G  G  P  S  G  F  P  M  T  V  I

7681        TTCAACTCTTTCATCAACCTCTTCTATTTGCAGGCAGCGTGGATCCAGTTGGCCAAAGAA
2560        F  N  S  F  I  N  L  F  Y  L  Q  A  A  W  I  Q  L  A  K  E

7741        CATGGACGAAATGATATTGCCCATCCTTGCTTTTACAAAAAATTCGTGCGGGCGTACGTC
2580        H  G  R  N  D  I  A  H  P  C  F  Y  K  K  F  V  R  A  Y  V

7801        TATGGTGATGACAACATTGTTAGCATTAAGGAGGAAGTGATTTCATGGTACAATCTTTGC
2600        Y  G  D  D  N  I  V  S  I  K  E  E  V  I  S  W  Y  N  L  C

7861        ACAGTCTCCTCCTTTCTTAAGGATGCTTTTGGTGTGACGATGACGGATGGGGAGAAAAAT
2620        T  V  S  S  F  L  K  D  A  F  G  V  T  M  T  D  G  E  K  N

7921        CAAGCGCACCTAGCAAAACCATATGGAAACATTCTGGAGTTTGACTTCCTTAAAAGAGGA
2640        Q  A  H  L  A  K  P  Y  G  N  I  L  E  F  D  F  L  K  R  G

7981        TTTCTCGCTGACACACAGATACCTTCCTTGTTCCATGCTCCCCTAAATAGGACTAGTATC
2660        F  L  A  D  T  Q  I  P  S  L  F  H  A  P  L  N  R  T  S  I

8041        GAAGAGCAAGTCTACTGGATAAGAAAAGGAGGAGATGCTGCCGAGCTGTTGCAGGCAAAC
2680        E  E  Q  V  Y  W  I  R  K  G  G  D  A  A  E  L  L  Q  A  N
```

```
8101          GCAGAGAACGCACTTTACGAGGCGAGCCATCATGGGCGCGAGTACTTTGACGAACTGCGA
2700          A  E  N  A  L  Y  E  A  S  H  H  G  R  E  Y  F  D  E  L  R

8161          TCTGTTGTGCGTGAGGCCTACAGGAGGATTTGCAAGGACGTGGTTCTGCCTACCTATATC
2720          S  V  V  R  E  A  Y  R  R  I  C  K  D  V  V  L  P  T  Y  I

8221          ATGTGTAGGCAAAGATGGCTAACCACGGACCTAGGAGAGGTCTCAACGAACAGTATCCCC
2740          M  C  R  Q  R  W  L  T  T  D  L  G  E  V  S  T  N  S  I  P

8281          AGCAAGGTAAACATACTTGTCTCAGCTCAACGAAACACTTTCAGGGGCGCTGCAGCACAA
2760          S  K  V  N  I  L  V  S  A  Q  R  N  T  F  R  G  A  A  A  Q

8341          AGATACGGAGGTACAAGCGTGAGAACC 8367 nt
2780          R  Y  G  G  T  S  V  R  T   2788 aa
```

**Apêndice 3.** Alinhamento múltiplo para a região parcial codificadora da polimerase (RdRp) de isolados de sequivirus disponíveis no GenBank, realizado pelo ClustalW.

```
DQ675190        GCGGCTCTATCTTGATTTTAATGTGGTTACCATGGCGAACAGACACAAGCATGGTATAAT
DQ675191        ACGGCTCTATCTTGATTTTAATGTAGTTACCATGGCGAACAGACACAAGCATGGCATAAT
LeMoV           ACGGCTCTATCTTGATTTTAATGTGGTAACCATGGCGAACAGACACAAGCATGGTATAAT
AM039965        ACGACTCTATCTCGACTTTAACGTCGTTACCATGGCAAACAGACATAAGCACGGCATAAT
DQ675189        AAGGTTGTACCTAGACTTCAATGTTCTAACAATGGCAAATCGACATAAGCACGGAATTAT
NC_003628       AAGGCTTTTCCTGGACTTCAACGTCTTTGTTATGGCCAATAGACATAAGCATGGTATTAT
EU980442.1      GAGATTGTTCCTTGACTTCAATGTTTTTGTCATGGCAAATAGACACAAGCGTGGAATCAT
                  *  * *  ** ** ** ** **  *    ***** **  **** ****  ** ** **

DQ675190        GGTTGGCATAAACCCCCACTCCCGCGAATGGACAGAGCTGGCTCTAGGCCTTGCATCCTT
DQ675191        GGTTGGCATAAACCCCCACTCCCGCGAATGGACAGAGCTGGCTCTAGGACTTGCATCCTT
LeMoV           GGTTGGCATAAACCCCCACTCTCGCGAATGGACAGAGCTGGCTCTAGGACTTGCATCCTT
AM039965        GGTTGGCATAAACCCTCACTCTCGTGAATGGACAGAACTGGCTCTAGGGCTTGCCTCCTT
DQ675189        GGTTGGAATAAATCCACATTCGAGGGAGTGGACAGAAATGGCTATCTCTTTGGCCTCTTT
NC_003628       GGTTGGGATAAATCCGCATTCAAGGGAATGGTCTGACTTAGCTATATCTCTTGCCTCTTT
EU980442.1      GGTAGGAATAAACCCGCACTCACGTGAGTGGTCCGACTTGGCTATTTCCCTGGCTTCTTT
                *** ** ***** ** ** **  * ** *** * **  * *** *     * ** ** **

DQ675190        TTCACCAATAGGGTTCAATGGCGACTTTGCGAACTTTGATGGTATGTTTCACCCCGATGC
DQ675191        TTCGCCAATAGGGTTCAATGGCGACTTTGCGAACTTTGATGGCATGTTTCACCCCGAAGC
LeMoV           CTCACCGATAGGATTCAATGGCGATTTTGCGAACTTTGATGGCATGTTTCACCCCGATGC
AM039965        CTCGCCAATAGGATTCAATGGAGATTTTGCAAACTTCGATGGCATGTTCCATCCTGATGC
DQ675189        TTCTCCTCTCGGTTTCAATGGTGACTTCGCTAACTTTGACGGAATGTTCCACCCAGATTC
NC_003628       CTCCCCTTACGGATTTAACGGCGACTTCGCCAATTTTGATGGAATGTTCCACCCCTCTTC
EU980442.1      TTCCCCATATGGTTTCAACGGGGATTTTGCCAACTTTGATGGAATGTTCCACCCCACCTC
                 ** **    ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** **     *

DQ675190        GTTCGACATGGTGTGCGATCTAGCTAACAAATTCTATGGCGACAGCAGAGGGGCCGAGCG
DQ675191        TTTCGACATGGTGTGTGATCTAGCTAACAAATTCTATGGCGACAGCAGAGGGGCCGAGCG
LeMoV           TTTCGACATGGTGTGCGATCTAGCTAACAAATTCTATGGCGACAGCAGAGGGGCCGAGCG
AM039965        TTTTGAGATGGTGTGTGACCTAGCCAACAAATTCTATGGTGATAGCAGAGGGCCTGAGAG
DQ675189        CTTTGCTATGGTGGAGGAGTTAGCCACCTACTTTTACAGAGGCCACAATGCATTGGAAAG
NC_003628       TTTTTCAATGGTCTCTGAGTTGGCCAACATCTTTTATGGAAACTTTCTTTCTACAGAGAG
EU980442.1      TTTCGATATGGTGGCAGAGCTTGCCAATATCTTTTATGGTGGTTTCCAAAGTGATGAGAG
                 **    *****    **  * ** *     ** **  *                **  *

DQ675190        GAAATGTCTCACGGAAGCTCTTACCAACAGACTATCTCTCGTCAAAGGTTCCGTTCTAAG
DQ675191        GAAATGTCTCACGGAAGCTCTTACCAACAGACTATCCCTCGTCAAAGGTTCCGTTCTAAG
LeMoV           AAAATGTCTCACTGAAGCCCTCACCAACAGACTATCCCTCGTCAAAGGTTCCGTTCTAAG
AM039965        GAAATGTCTTACAGAAGCTCTCACCAATAGATTGTCTCTTATCAAGGGCTCAGTGTTGAG
DQ675189        GAAAACTCTCACAGAATCGTTGACGAACAGGTTGTCCCTTGTCAAGGGAGCGGTGTTGAG
NC_003628       GGACAACTTGACTAGGATGTTAACCAATAGATTTTCACTTATGAAGGGAGCTATTCTCAG
EU980442.1      AACCAGTTTGACAAAAGCCCTTACCAACAGATTTTCTTTAGTCAAAGGAGGGGTTCTAAG
                        * **        * ** ** **  * **  *  * ** **     *  * **

DQ675190        CATTGGAGGAGGGGGCCCCTCAGGATTTCCCATGACTGTGATCTTCAACTCTTTCATTAA
DQ675191        CATTGGAGGAGGGGGCCCCTCAGGATTTCCCATGACTGTGATCTTCAACTCTTTCATTAA
LeMoV           CATTGGAGGAGGGGGCCCCTCAGGATTTCCCATGACTGTGATCTTCAACTCTTTCATCAA
AM039965        TATAGGAGGGGGAGGACCTTCTGGATTTCCCATGACTGTGATCTTCAATTCATTCATCAA
DQ675189        TATTGGAGGAGGGGGTCCTTCAGGATTTCCTATGACAGTCATTTTTAACTCATACATTAA
NC_003628       AGTTCCTGGAGGAGGACCCTCTGGATTTCCCATGACTGTGATATTTAATTCTTTTATTAA
EU980442.1      AATTTCAGGAGGAGGGCCTTCAGGTTTTCCCATGACTGTGATCTTCAATTCCTTCATAAA
                  *    ** ** ** ** ** ** ***** ***** ** ** ** ** ** *  ** **

DQ675190        CCTCTTCTATTTGCAGGCAGCGTGGATCCAGTTGGCCAAAGAACACGGACGAAGTGACAT
DQ675191        CCTCTTCTATTTGCAGGCAGCGTGGATCCAGTTGGCCAAAGAACACGGACGAAATGACAT
LeMoV           CCTCTTCTATTTGCAGGCAGCGTGGATCCAGTTGGCCAAAGAACATGGACGAAATGATAT
AM039965        TCTTTTCTACCTGCAGGCAGCATGGATTCAGTTGGCCAAAGAGCATGGACGTGATGACAT
DQ675189        CTTGTTCTATCTAATGAGTGCCTGGTCCCACCTCGCAACCGACAATGGCAGAGTGGACAT
NC_003628       TTTATTCTATTTGCAGAGTGCGTGGATAATGTTGGCTAGGTTTAATGGTAGGCAGGATAT
EU980442.1      CCTCTTCTATTTGCAGAGTGCATGGATTATGTTAGCTAGTCAGAATGGGAGATCTGACAT
                  * *****  *   *   ** ***       * ** *      * **  *    ** **
```

```
DQ675190        TGCCCATCCTTGCTTTTACAAAAAATTTGTGCGAGCGTACGTCTATGGTGATGACAACAT
DQ675191        TGCCCATCCTTGCTTTTACAAAAAATTTGTGCGAGCGTACGTCTATGGTGATGACAACAT
LeMoV           TGCCCATCCTTGCTTTTACAAAAAATTCGTGCGGGCGTACGTCTATGGTGATGACAACAT
AM039965        TGCCCATCCTTGTTTTTATAAGAAATTTGTGAGAGCTTATGTCTACGGGGACGACAATAT
DQ675189        ACAACACCCATCTTTCTTCAAGAAGTACGTGAGAGCTTGCGTCTATGGAGACGACAATAT
NC_003628       CTCCCACCCTTGTAATTTCCCCAAGTATGTCAGAGCGTGCGTTTATGGGGATGATAACAT
EU980442.1      CTCGTGTCCAAGCAACTTCCCAAGCTTTGTAAGAGCCTGTGTCTACGGTGACGATAATAT
                       **       *     *  *  **  * ** *  ** ** ** ** ** ** **

DQ675190        TGTTAGCATTAAGGAGGAAGTAATTTCATGGTACAATCTCTGCACAGTCTCCTCCTTTCT
DQ675191        TGTTAGCATTAAGGAGGAAGTAATTTCATGGTACAATCTTTGCACAGTCTCCTCCTTTCT
LeMoV           TGTTAGCATTAAGGAGGAAGTGATTTCATGGTACAATCTTTGCACAGTCTCCTCCTTTCT
AM039965        AGTCAGCATTAAGGAGGAGGTGATCTCATGGTATAATCTTTGCACAGTTTCTTCCTTTCT
DQ675189        CGTGAGTATAAAGGAGGAGGTTATATCGTGGTACAATTTGTGCTCAGTATCCGACTTCCT
NC_003628       TGTGGCTATCAAGATGGAGGTTTTACCTTGGTACAATCTTCAGACTGTTTCAGAAGCTCT
EU980442.1      TGTGGCCATCAAGAACGAGGTCTTGCCCTGGTATAATTTGCAAACGGTGTCAAAAATTCT
                 **    ** ***   ** **  *  * ***** *** *     * ** **       **

DQ675190        TAAGGATGCTTTTGGTGTAACG
DQ675191        TAAGGATGCTTTTGGTGTGACG
LeMoV           TAAGGATGCTTTTGGTGTGACG
AM039965        CAAGGATGCTTTTGGAGTAACA
DQ675189        TAAAAAAGCATTTGGTGTCACC
NC_003628       CTTTGACTACTTTGGAGTAACT
EU980442.1      CAAGGATTATTTTGGTGTGACC
                     *    ***** ** **
```