

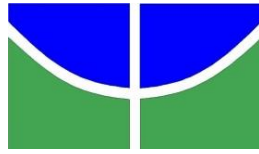
Universidade de Brasília-UnB
Instituto de Ciências Biológicas-IB
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Estudos biológicos e moleculares dos
patossistemas *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV)
e *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) em
gramíneas forrageiras**

Karina Nascimento da Silva Fragoso

Orientador: Renato de Oliveira Resende

Brasília, 2019



Universidade de Brasília-UnB
Instituto de Ciências Biológicas-IB
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Estudos biológicos e moleculares dos
patossistemas *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV)
e *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) em
gramíneas forrageiras**

Karina Nascimento da Silva Fragoso

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor (a) em Biologia Molecular.

Orientador: Renato de Oliveira Resende

Brasília, 2019



Universidade de Brasília-UnB
Instituto de Ciências Biológicas-IB
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Estudos biológicos e moleculares dos
patossistemas *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV)
e *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) em
gramíneas forrageiras**

Karina Nascimento da Silva Fragoso

CAPÍTULO 1: Introdução geral

CAPÍTULO 2: Biological and molecular characterization of a highly divergent *Johnsongrass mosaic virus* isolate from *Pennisetum purpureum*

CAPÍTULO 3: Sequência completa do genoma de *Maize chlorotic dwarf virus*.

CAPÍTULO 4: Localização subcelular das proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 de *Maize chlorotic dwarf virus*

KARINA NASCIMENTO DA SILVA FRAGOSO

**Estudos biológicos e moleculares dos
patossistemas *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV)
e *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) em
gramíneas forrageiras**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende (Orientador)
(CEL-UnB)

Prof. Dr. Tatsuya Nagata
(CEL-UnB)

Dra. Marília Santos Silva
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Prof. Dr. José Raimundo Correa
(CEL-UnB)

Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho (Suplente)
(Fito/Biomicro-UnB)

“You look at science (or at least talk of it) as some sort of demoralising invention of man, something apart from real life, and which must be cautiously guarded and kept separate from everyday existence. But science and everyday life cannot and should not be separated”

“Você vê a ciência (ou pelo menos fala disso) como uma espécie de invenção desmoralizante do homem, algo à parte da vida real, e que deve ser cautelosamente guardado e mantido separado da existência cotidiana. Mas a ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas.”

_Rosalind Franklin

A minha filha Alice, ao meu marido Rodrigo e aos meus pais Humberto e Nazaré, pelo amor incondicional, pelo carinho, e pelo apoio durante toda minha vida acadêmica, dedico.

ÍNDICE

Resumo.....	01	
Abstract.....	03	
CAPÍTULO 1: Introdução geral		
1.1. A importância das pastagens.....	05	
1.2. Vírus que infectam gramíneas forrageiras.....	08	
1.3. Família <i>Potyviridae</i>	10	
1.3.1. Gênero <i>Potyvirus</i>	13	
1.3.2. Organização genômica e replicação.....	15	
1.3.3. Movimento viral.....	18	
1.3.4. Transmissão.....	21	
1.3.5. <i>Johnsongrass mosaic virus</i>	21	
1.4. Família <i>Secoviridae</i>	23	
1.4.1. Gênero <i>Waikavirus</i>	26	
1.4.2. <i>Maize chlorotic dwarf virus</i>	28	
1.5. Objetivos do trabalho proposto.....	31	
1.6. Referência bibliográfica.....	32	
CAPÍTULO 2: Biological and molecular characterization of a highly divergent <i>Johnsongrass mosaic virus</i> isolate from <i>Pennisetum purpureum</i>		37
CAPÍTULO 3: Sequência completa do genoma de <i>Maize chlorotic dwarf virus</i>		
3.1. Introdução.....	51	
3.2. Materiais e Métodos.....	53	
3.2.1. Obtenção dos isolados de <i>Maize chlorotic dwarf virus</i> (MCDV).....	53	
3.2.2. Enriquecimento da fração viral.....	53	
3.2.3. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática.....	54	
3.2.4. Detecção de MCDV por RT-PCR nas plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho.....	55	
3.2.5. Clonagem da CP de MCDV das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho.....	56	
3.2.6. Isolamento da região 3' do genoma de MCDV - 3'RACE.....	56	

3.2.7. Isolamento da região 5' do genoma de MCDV - 5'RACE.....	58
3.2.8. Árvore filogenética.....	59
3.3. Resultados e Discussão.....	60
3.4. Conclusão.....	65
3.5. Referências bibliográficas.....	65
CAPÍTULO 4: Localização subcelular das proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 de <i>Maize chlorotic dwarf virus</i>	
4.1. Introdução.....	67
4.2. Material e Métodos.....	69
4.2.1. Predição de localização subcelular.....	69
4.2.2 Amplificação dos genes virais que codificam para as proteínas P1, CP1, CP2 e CP3.....	70
4.2.3. Clonagem no vetor de entrada pDONR 207.....	72
4.2.4. Clonagem no vetor de destino pK7FWG2.....	73
4.2.5. Co-localização com marcadores fluorescentes para organelas.....	74
4.2.6. Agroinfiltração em plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	74
4.3. Resultados e Discussão.....	75
4.3.1. Localização citoplasmática das proteínas P1 e CP3.....	76
4.3.2. Localização da proteína CP1 nas mitocôndrias.....	80
4.3.3. Localização da proteína CP2 e CP3 no núcleo.....	82
4.4. Conclusões e Perspectivas.....	86
4.5. Referência bibliográfica.....	87

LISTA DE FIGURA

Figura 1.1: Partícula viral da família <i>Potyviridae</i>	11
Figura 1.2: Organização genômica dos gêneros virais monopartido e bipartido da família <i>Potyviridae</i>	12
Figura 1.3: Mapa genômico do gênero <i>Potyvirus</i>	15
Figura 1.4: Representação esquemática dos principais eventos no ciclo de infecção por potyvirus.....	20
Figura 1.5: Esquema de partícula viral icosaédrica característica de espécies da família <i>Secoviridae</i>	23
Figura 1.6: Organização genômica de membros representativos da família <i>Secoviridae</i>	25
Fig. 2.1: Virus particles of <i>Johnsongrass mosaic virus</i> JGMV-CNPGL isolate infecting <i>Pennisetum purpureum</i>	41
Fig. 2.2: Phylogenetic analysis using <i>Potyvirus</i> nucleotide sequences of the polyprotein.....	42
Fig. 2.3: Comparison matrix sequence and phylogenetic analysis of amino acids CP gene sequence JGMV-CNPGL with others JGMV sequences deposited in the GenBank from three different countries.....	45
Figura 3.1: Sintomas de infecção por vírus observados em bancos ativos de germoplasma da Embrapa Gado de Corte.....	53
Figura 3.2: Eletroforese de 3'UTR de MCDV-BR.....	57
Figura 3.3: Eletroforese de 5'UTR de MCDV-BR.....	59
Figura 3.4: Organização genômica do vírus MCDV-BR.....	61
Figura 3.5: Árvore filogenética utilizado as sequências de aminoácidos da polimerase (Pol) das espécies virais da família <i>Secoviridae</i>	64
Figura 3.6: Árvore filogenética utilizado as sequências de aminoácidos da capa proteica (CP) das espécies virais da família <i>Secoviridae</i>	64
Figura 4.1: RT-PCR de fragmentos correspondentes as proteínas de MCDV-BR em estudo.....	71
Figura 4.2: Esquema representativo do vetor de entrada pDONR207.....	72

Figura 4.3: Esquema representativo do vetor de destino PK7FWG2.....	74
Figura 4.4: Visualização em microscópio confocal Leica SP8 da expressão transiente da proteína P1 do MCDV-BR fusionada com eGFP em folhas de <i>N. benthamiana</i> 2 dpa.....	77
Figura 4.5: Visualização em microscópio confocal Leica SP8 da expressão transiente da proteína CP3 do MCDV-BR fusionada a eGFP em folhas de <i>N. benthamiana</i> 2 dpa.....	78
Figura 4.6: Visualização em microscópio confocal Leica SP8 da expressão transiente do vetor binário pK7FWG2 vazio expressando GFP agroinfiltrado em folhas de <i>N. benthamiana</i> 2 dpa.....	78
Figura 4.7: Visualização em microscópio confocal Leica SP8 da expressão transiente das proteínas P1(A) e CP3(B) do vírus MCDV-BR fusionadas a eGFP agroinfiltradas em folhas de <i>N. benthamiana</i> 2 dpa.....	79
Figura 4.8: Visualização em microscópio confocal Leica SP8 da expressão transiente da proteína CP1 do MCDV-BR fusionada a eGFP em folhas de <i>N. benthamiana</i> 2 dpa.....	82
Figura 4.9: Visualização em microscópio confocal Leica SP8 da expressão transiente das proteínas CP2 e CP3 de MCDV-BR fusionadas a eGFP em folhas de <i>N. benthamiana</i> 2 dpa.....	83

LISTA DE TABELA

Tabela 1.1: Vírus relatados infectando acessos de <i>Brachiaria</i> , <i>Panicum</i> e <i>Pennisetum</i> ..	09
Tabela 1.2: Características dos gêneros da família <i>Potyviridae</i>	14
Tabela 1.3: Características e funções das proteínas codificadas por <i>Potyvirus</i>	16
Tabela 1.4: Espécies de vírus pertencentes ao gênero <i>Waikavirus</i> aceitas pelo comitê taxonômico de vírus (ICTV).....	27
Table 2.1: Accession numbers of polyprotein sequences of distinct Potyviruses.....	43
Tabela 3.1: Plantas utilizadas no processo de enriquecimento viral para o sequenciamento do genoma completo do MCDV e detecção do vírus por RT-PCR.....	54
Tabela 4.1: Predição de localização subcelular das proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 do vírus MCDV.....	70
Tabela 4.2: Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma
µg/ml	micrograma por mililitro
µl	microlitros
µm	micrômetros
µM	micromolar
aa	aminoácidos
Amp (R)	gene de resistência a ampicilina
att	do inglês, <i>attachament sites</i>
BiFC	Fluorescência Bimolecular Complementar
cDNA	DNA sintetizado a partir de um molde de RNA
dpa	dias pós agroinfiltração
DNA	ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
kb	mil pares de bases
kDa	quilodáltons (kilodaltons)
Km(R)	gene de resistência à canamicina
LB	meio de cultura Luria-Bertani
M	molar
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
ng	nanogramas
CP	Capa protéica
PD	Plasmodesma
MCDV	<i>Maize chlorotic dwarf virus</i>
JGMV	<i>Johnsongrass mosaic virus</i>
VRCs	Complexos de replicação viral

Resumo

O Brasil tem o maior rebanho bovino comercial do mundo, destinado para produção de carne e leite, sendo majoritariamente alimentado com pastagens. A alta incidência de pragas e doenças afeta campos com pastagens, sendo que os agentes biológicos nem sempre são identificados. Sintomas típicos de infecções virais como mosaico, amarelecimento generalizado e nanismo vêm sendo observados em campos experimentais e comerciais de pastagens naturais e cultivadas. Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou duas espécies virais infectando *Pennisetum purpureum*, *Panicum maximum* e *Brachiaria brizantha* por meio do sequenciamento em larga escala (High-Throughput sequencing-HTS): o *Johnsongrass mosaic virus* (isolado JGMV-CNPGL) e o *Maize chlorotic dwarf virus* (isolado MCDV-BR). A partir dessa identificação preliminar, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização biológica e molecular desses dois isolados, bem como realizar a localização subcelular das proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 do vírus MCDV-BR, tendo em vista que as funções destas proteínas são pouco elucidadas. A caracterização biológica de JGMV-CNPGL e MCDV-BR é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de defesa contra esses agentes etiológicos com alto poder de infecção em plantas forrageiras colocando em risco o setor pecuário nacional, entretanto não foi realizada para o MCDV-BR, pois o vírus não passa mecanicamente e o vetor de transmissão não foi identificado. O isolado JGMV-CNPGL, identificado em plantas de *P. purpureum*, foi inoculado mecanicamente em 14 espécies de plantas indicadoras, sendo que 10 delas foram suscetíveis. O genoma desse vírus possui 9.865 nt, que codifica 11 proteínas (P1, HC-Pro P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NlB, CP e PIPO). Os valores de identidade de nucleotídeos da capa proteica (CP) e do genoma completo obedecem aos critérios de demarcação de espécie para o gênero *Potyvirus*.

Alguns motivos conservados característicos de *Potyvirus* foram identificados nas proteínas codificadas por esse vírus, entretanto, o motivo KITC da HC-Pro, envolvido na interação da partícula viral com o estilete do vetor (Afídeo), não está presente. Vale ressaltar que a porção N-terminal da CP mostrou apenas 38% de identidade de sequência de aminoácidos quando comparados com outros isolados de JGMV caracterizados em outras regiões do mundo. As implicações biológicas dessa divergência de sequências precisam ser elucidadas. O genoma de MCDV-BR, encontrado infectando *Brachiaria*, possui 11.960 nt com uma ORF1 codificando uma poliproteína de 9 proteínas (P1, CP1, CP2, CP3, R37, Hel, R69, 3C-Pro e RdRP) e uma pequena ORFx, interna e próxima da extremidade 5' da ORF1. A comparação de sequência aminoácidos das CPs (CP1, CP2 e CP3) e RdRp (Pol) se encaixa dentro dos critérios de demarcação de espécie para gênero *Waikavirus*, identificando este isolado como pertencente a espécie MCDV. A localização subcelular de proteínas de MCDV-BR em fusão com eGFP, confirmada por co-localização com marcadores de organelas, demonstrou que a proteína P1 está presente no citoplasma, próximo a parede celular, CP1 é endereçada a mitocôndria, CP2 forma agregados no núcleo e CP3 está no citoplasma próximo a parede celular e também forma agregados no núcleo. Experimentos complementares devem ser realizados para comprovar a localização subcelular, podendo auxiliar na predição de funções das proteínas virais.

Palavras-chave: *Pennisetum purpureum*; *Panicum maximum*; *Brachiaria brizantha*; *Johnsongrass mosaic virus*; *Maize chlorotic dwarf virus*; localização subcelular

Abstract

Brazil has the largest commercial cattle herd in the world, used for beef and dairy production, being mainly fed on pastures. The high incidence of pests and diseases affects fields with pastures, and biological agents are not always identified. Typical symptoms of viral infections such as mosaic, widespread yellowing and dwarfism have been observed in experimental and commercial fields of natural and cultivated pastures. Our research group recently identified two viral species infecting *Pennisetum purpureum*, *Panicum maximum* and *Brachiaria brizantha* by High-Throughput sequencing: *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV-CNPGL isolate) and *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV-BR isolate). From this preliminary identification, the objective of this work was to perform the biological and molecular characterization of these two isolates, as well as to perform the subcellular localization of proteins P1, CP1, CP2 and CP3 of the MCDV-BR virus. From this preliminary identification, the objective of this work was to carry out the biological and molecular characterization of these two isolates, as well as to perform the subcellular localization of MCDV-BR virus proteins P1, CP1, CP2 and CP3, considering that their functions are poorly understood. The biological characterization of JGMV-CNPGL and MCDV-BR is fundamental for the development of defense strategies against these etiological agents with high potential infection in forage plants putting at risk the national livestock sector. However, characterization of MCDV-BR was not performed, because this virus does not pass mechanically, and the transmission vector was not identified. The JGMV-CNPGL isolate, identified in *P. purpureum* plants, was mechanically inoculated in 14 host plant candidates, 10 of which were susceptible. The genome of this virus has 9,865 nt, which encodes 11 proteins (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb, CP and PIPO). The nucleotide identity values of CP and the complete genome obey the species demarcation criteria for the genus *Potyvirus*. Some

conserved motifs characteristic of *Potyvirus* have been identified in proteins encoded by this virus, however, the HC-Pro KITC motif, involved in the interaction of the viral particle with the vector stylets (Aphid), is not present. It is noteworthy that the N-terminal portion of CP showed only 38% amino acid sequence identity when compared to other JGMV isolates characterized in other regions of the world. The biological implications of this sequence divergence need to be elucidated. The MCDV-BR virus genome, found infecting *Brachiaria*, has 11,960 nt with an ORF1 encoding a polyprotein with 9 proteins (P1, CP1, CP2, CP3, R37, Hel, R69, 3C-Pro and RdRP) and a small ORFx, internal and near the 5' end of ORF1. The peptide sequence comparison of the CPs (CP1, CP2 and CP3) and Pol (RdRp) fits within the species demarcation criteria for *Waikavirus* genus, identifying this isolate as belonging to the MCDV species. The subcellular localization of MCDV-BR proteins fused with eGFP, confirmed by co-localization with organelle markers, demonstrated that protein P1 is present in the cytoplasm, near the cell wall, CP1 is addressed to mitochondria, CP2 forms nucleus aggregates. and CP3 is in the cytoplasm near the cell wall and forms aggregates in the nucleus. However, complementary experiments should be performed to prove subcellular localization, which may aid in the prediction of viral protein functions.

Keywords: *Pennisetum purpureum*; *Panicum maximum*; *Brachiaria brizantha*; *Johnsongrass mosaic virus*; *Maize chlorotic dwarf virus*; subcellular localization

CAPÍTULO 1: Introdução geral

1.1. Importância das pastagens

A introdução no Brasil de gramíneas forrageiras originárias da África colaborou de forma positiva para o desenvolvimento da bovinocultura nacional (ABIEC, 2009). A produção de carne e leite no Brasil é com base na utilização de forrageiras e, entre outros fatores, temos um dos menores custos de produção do mundo (FERRAZ e Felício, 2010).

Essas forrageiras são plantadas em solos com baixa fertilidade e alta acidez, impróprios para lavouras, pois exige um certo investimento em adubação para a correção de solos. Uma das forrageiras mais plantadas no Brasil é a Braquiária. O gênero *Brachiaria* é constituído por aproximadamente 100 espécies, com a taxonomia ainda mal definida (Valle et al., 2001). Desempenham um papel primordial na produção de carne e leite no Brasil, por viabilizarem a pecuária em solos ácidos e de baixa fertilidade (Souza et al., 2006). São plantadas nas regiões Centro-Oeste e Norte do país, sendo a cultivar *B. brizantha* cv. Marandu a mais plantada (Andrade e Valentim, 2004), lançada pela Embrapa Gado de Corte.

Panicum maximum é plantado em áreas com maior fertilidade de solo, indicado para sistemas intensivos de produção animal e no sistema de Integração Lavoura-Pecuária (ILP) (Gonçalves e Fanchini, 2007). Sua introdução no Brasil não é bem conhecida, vários autores sugerem que os primeiros exemplares dessa espécie vieram da África em navios negreiros, onde eram utilizados como cama para os escravos, e uma vez aqui, se alastraram rapidamente, dando origem a primeira cultivar, o capim Colômbio (Parsons, 1972; Jank, 1995; Herling et al., 2001). A primeira cultivar propositalmente introduzida no Brasil foi a Tobiatã (1978), que foi selecionada na África e lançada pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Araujo et al., 2008). As principais cultivares de *P. maximum* atualmente comercializadas são Tanzânia, Mombaça e Massai (Jank et al.,

2008), lançada pela Embrapa Gado de Corte, e cv. Vencedor, lançada pela Embrapa Cerrados (Aranovich, 1995).

Pennisetum purpurem, conhecido como Capim elefante ou Capim napiê, é plantado em solos de maior fertilidade. O capim elefante foi introduzido no Brasil por mudas provenientes de Cuba em 1920 e se adaptou a diferentes tipos de solo, com exceção de solos mal drenados (Otero, 1961). É uma planta que produz muita biomassa, entretanto apresenta a desvantagem de ser propagado vegetativamente (colmos), pois as sementes não são viáveis (Otero, 1961; Araujo et al., 2008). Desde o início da utilização da espécie, somente as cultivares Merker e Napier eram conhecidas, mas atualmente existem mais duas cultivares Capricorn e Merkiron em uso. Devido ao seu elevado potencial de produção de forragem de boa qualidade, houve uma rápida e ampla disseminação do capim-elefante por todo o país (Araujo et al., 2008). Recentemente, seu potencial como fonte de biomassa para a produção de bioetanol tem sido estudado (Yasuda et al., 2014).

Panicum maximum divide o espaço no mercado sementeiro no Brasil com as *Brachiarias* (Hacker e Jank, 1998). Paralelamente, uma robusta indústria de produção de sementes coloca o Brasil como o maior produtor, consumidor e exportador mundial de sementes de forrageiras tropicais. A produção total é de cerca de 100 mil toneladas por ano, atingindo valores de mais de 200 milhões de euros devido a exportação para mais de 20 países de aproximadamente 10% da produção total (Souza et al., 2006).

As pastagens ocupam atualmente 158,7 milhões de hectares (IBGE, 2017b) e representam a principal fonte de alimento para um rebanho bovino de aproximadamente 171,8 milhões de cabeças (IBGE, 2017a). O Brasil segue como o segundo maior produtor mundial de carne bovina (ABIEC, 2019) e tem ocupado desde 2004 a posição de maior exportador de carne bovina do mundo, sendo responsável por 19,3% do mercado internacionalmente (ABIEC, 2019).

Um dos principais problemas nas áreas destinadas ao cultivo da pastagem é a alta incidência de pragas e doenças, pois restringe o potencial produtivo das plantas forrageiras. Em decorrência da intensificação no cultivo de pastagens, observou-se o aumento proporcional de doenças que causam perdas em produtividade e qualidade das pastagens, como também provocando a morte das plantas (Verzignassi e Fernandes, 2001).

Todavia, nem sempre os patógenos causadores das doenças são identificados taxonomicamente e, portanto, o conhecimento sobre os agentes etiológicos, principalmente aqueles que afetam a produtividade das pastagens, ainda é limitado. Com isso, há dificuldades no estabelecimento de medidas específicas para o manejo de doenças e melhoramento genético de plantas forrageiras (Marchi et al., 2011).

A escassez de dados na literatura a respeito de infecções virais em plantas forrageiras, assim como a falta de conhecimento dos agentes etiológicos de doenças virais nesse grupo de plantas no Brasil demonstram a necessidade da realização de um levantamento e de caracterização desses patógenos em áreas de pastagens. Nos últimos anos, tem sido relatada, frequentemente em campo, a ocorrência de sintomas típicos de infecções virais como mosaico, amarelecimento generalizado e nanismo em diversas plantas forrageiras. Essas ocorrências em campo indicam a possível presença de patógenos virais em áreas de pastagens naturais ou cultivadas e/ou áreas experimentais, notadamente nos campos experimentais da Embrapa Gado de Corte, em Mato Grosso do Sul. O problema observado exige uma ação integrada da pesquisa para a caracterização desses patógenos e o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle.

1.2. Vírus que infectam gramíneas forrageiras

A ocorrência de vírus infectando espécies de plantas forrageiras no Brasil ainda é pouco relatada e os danos econômicos são desconhecidos. Até o momento, são poucos os vírus que foram detectados infectando naturalmente plantas dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*, e que tiveram suas espécies identificadas. Já foram relatadas no mundo de 17 espécies virais infectando plantas forrageiras, pertencentes a 9 famílias: *Potyviriidae*, *Geminiviridae*, *Tombusviridae*, *Luteoviridae*, *Caulimoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bromoviridae*, *Secoviridae* e *Reoviridae*, que estão descritas na Tabela 1.1.

Na etapa inicial deste trabalho, foram identificados dois vírus infectando naturalmente plantas forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum* no Brasil, o *Johnsongrass mosaic virus*, pertencente a família *Potyviriidae* e gênero *Potyvirus*, e o *Maize chlorotic dwarf virus*, pertencente a família *Secoviridae* e gênero *Waikavirus* que são temas deste trabalho.

Tabela 1.1: Vírus relatados infectando *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*

Vírus	Família e Gênero	Hospedeiros
<i>Johnsongrass mosaic virus</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>
<i>Sugarcane mosaic virus</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>
<i>Panicum streak virus</i>	<i>Geminiviridae</i> <i>Mastrevirus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i>
<i>Maize dwarf mosaic virus</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>
<i>Maize streak virus</i>	<i>Geminiviridae</i> <i>Mastrevirus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>
<i>Panicum mosaic virus</i>	<i>Tombusviridae</i> <i>Sobemovirus</i>	<i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>
<i>Panicum mosaic Satellite virus</i>	Desconhecido	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i>
<i>Guinea grass mosaic virus</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	<i>Luteoviridae</i> <i>Luteovirus</i>	<i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>
<i>Pennisetum mosaic virus</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	<i>Pennisetum</i>
<i>Sorghum mosaic virus</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	<i>Pennisetum</i>
<i>Zea mosaic virus</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>	<i>Pennisetum</i>
<i>Sugarcane bacilliform virus</i>	<i>Caulimoviridae</i> <i>Badnavirus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i>
<i>Digitaria striate virus</i>	<i>Rhabdoviridae</i> <i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Brachiaria</i>
<i>Brome mosaic virus</i>	<i>Bromoviridae</i> <i>Bromovirus</i>	<i>Pennisetum</i>
<i>Maize chlorotic dwarf virus</i>	<i>Secoviridae</i> <i>Waikavirus</i>	<i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>
<i>Rice black streak dwarf fiji virus</i>	<i>Reoviridae</i> <i>Fijivirus</i>	<i>Panicum</i>

1.3. A família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* representa uma das maiores famílias de vírus de plantas já estudadas. Do ponto de vista econômico, essa família agrupa gêneros importantes para a agricultura, relacionados a inúmeras doenças em diversas culturas. Atualmente, 204 espécies são classificadas na família *Potyviridae*, menor apenas que a família *Geminiviridae*, que por sua vez conta com 439 espécies relatadas.

Segundo o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), essas 204 espécies de *Potyviridae* estão distribuídas em 10 gêneros (*Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Poacevirus*, *Bevemovirus*, *Roymovirus*, *Brambyvirus* e *Bymovirus*), que infectam exclusivamente plantas, sendo o gênero *Potyvirus* o mais abundante com 168 espécies virais reportadas (Adams et al., 2017). Os gêneros são diferenciados de acordo com o vetor de transmissão, gama de hospedeiros e organização genômica (Adams et al., 2017; Fauquet et al., 2005).

Os membros desta família possuem partículas flexuosas e filamentosas não envelopadas (Figura 1.1 A e B). Todos os gêneros apresentam genoma monopartido (Figura 1.2A), exceto o gênero *Bymovirus* que possui genoma bipartido (Figura 1.2B).

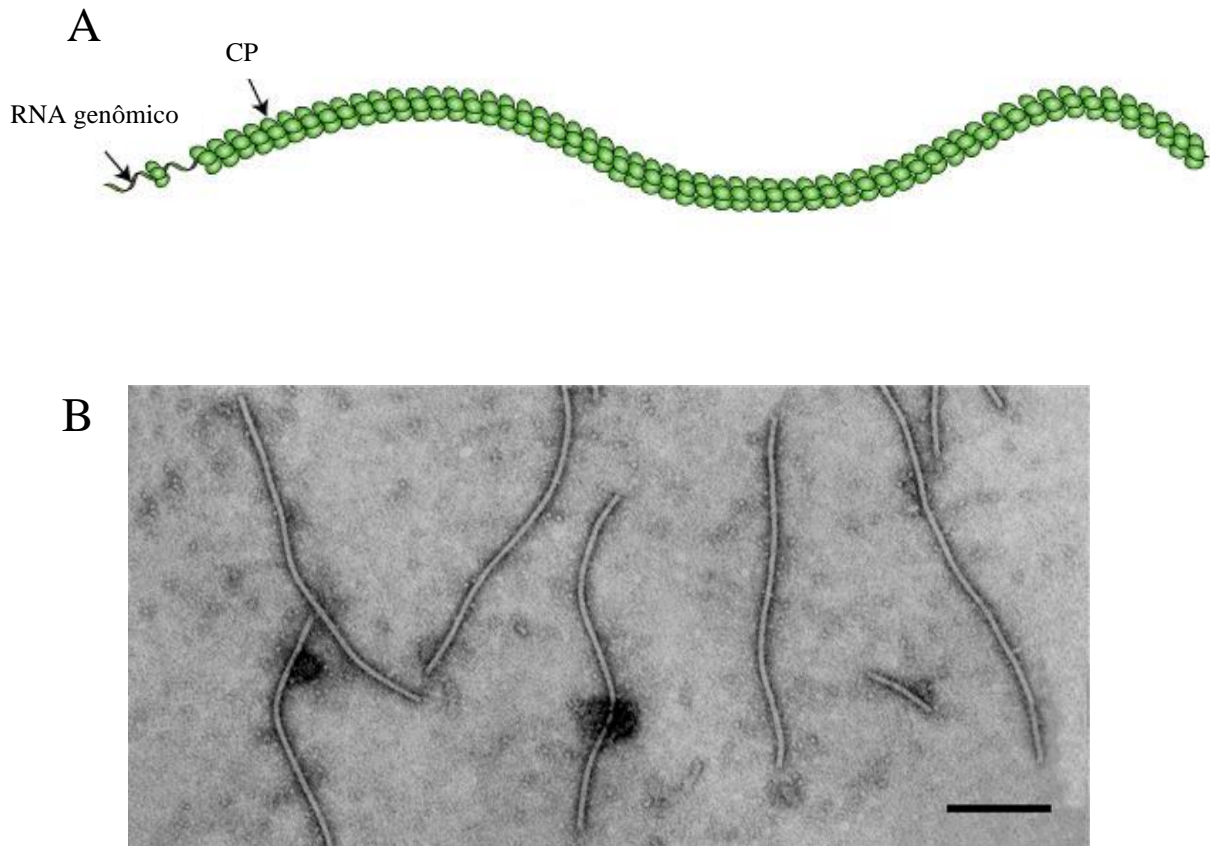


Figura 1.1: Partícula viral da família *Potyviridae*. **A:** Desenho esquemático de partícula viral alongada e flexuosa com simetria helicoidal característico de espécies da família *Potyviridae*. CP (Capa protéica). Fonte: Viralzone expazy; **B:** Micrografia eletrônica da partícula viral de *Plum pox virus*. A barra representa 200 nm. (Adams et al., 2017)

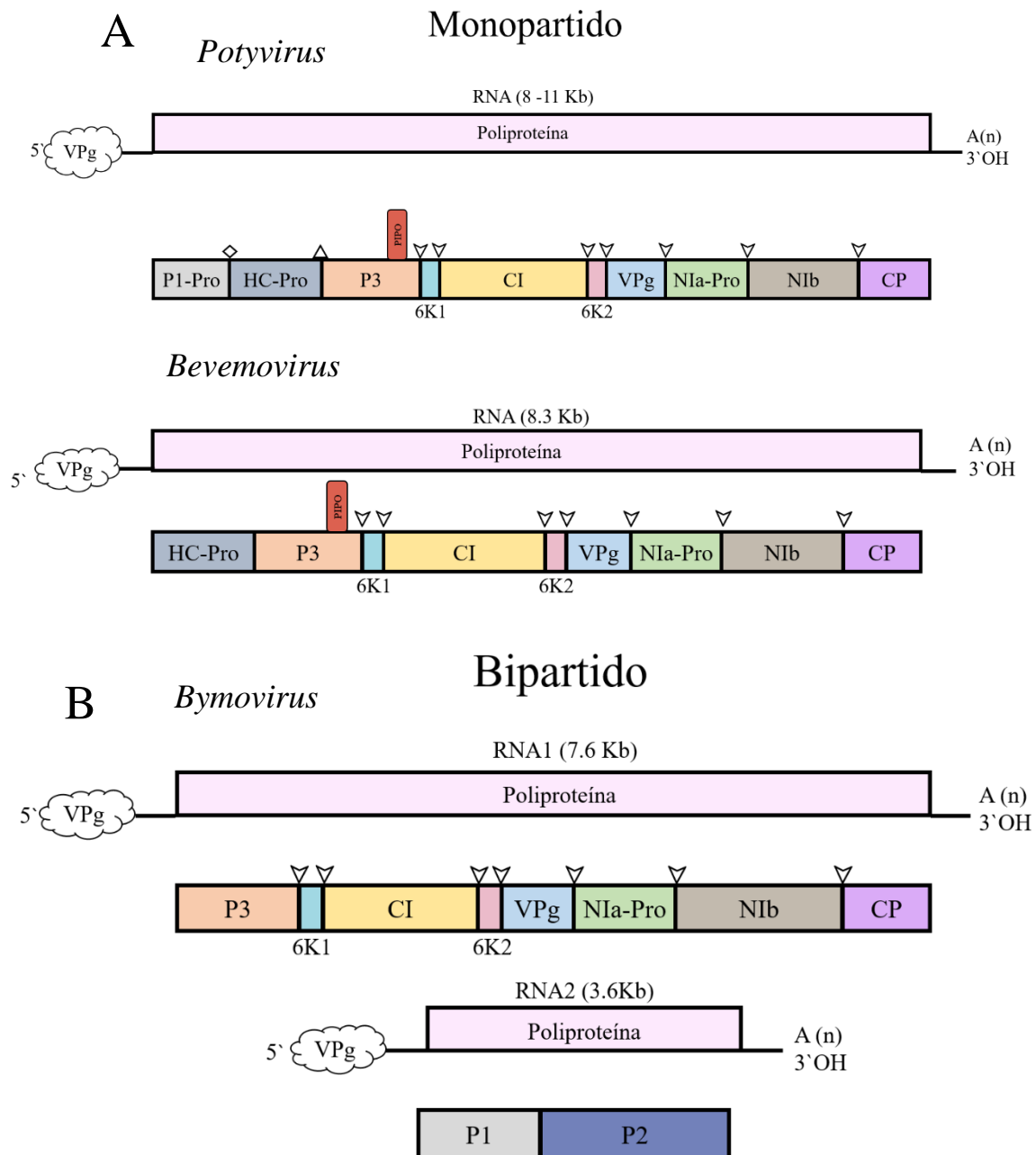


Figura 1.2: Organização genômica dos gêneros virais monopartido e bipartido da família *Potyviridae*. **A:** Genoma monopartido dos gêneros *Potyvirus* e *Bevemovirus*, linear, composto por um +ssRNA até 11 kb de tamanho. Na extremidade 3' tem uma cauda poli (A) e na extremidade 5' possui uma proteína ligada ao genoma, a VPg. **B:** Genoma bipartido composto por RNA1 de 7,6-7,8 kb e RNA2 de 3,5-3,8 kb. Na extremidade 3' tem uma cauda poli (A) e na extremidade 5' possui uma proteína ligada ao genoma, a VPg. Adaptado: (Adams et al., 2017) ▽ Sítio de clivagem NIa-Pro ▲ Sítio de clivagem HC-Pro ◇ Sítio de clivagem P1-Pro

Na família *Potyviridae* as espécies são diferenciadas seguindo os seguintes critérios: comparação de sequência de CP com identidade de aminoácidos menor que 80% ou nucleotídica menor que 76%, diferenças nos sítios de clivagem da poliproteína, gama de hospedeiros, patogenicidade, citopatologia, modo de transmissão e diferenças sorológicas (Adams et al., 2017).

Tradicionalmente, os métodos sorológicos constituíam a ferramenta mais comumente utilizada para a detecção de vírus de plantas, permitindo a diagnose rápida e simples da grande maioria dos vírus. Entretanto, a sorologia não é metodologia satisfatória quando aplicada à família *Potyviridae*, pois a relação sorológica entre essas espécies é complexa e inconsistente. A reação cruzada variável entre anti-soros produzidos em diferentes laboratórios para um mesmo vírus, a relação sorológica entre distintas espécies, isto é, anti-soro produzido contra uma espécie apresenta reação positiva com outras espécies diferentes, e a variação na reação cruzada entre estirpes de um mesmo vírus são os maiores problemas associados a sorologia de *Potyvirus*. Assim, existe necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas para a detecção precisa e identificação de espécies virais do gênero *Potyvirus* (Adams et al., 2017).

Nos últimos anos, um melhor entendimento da biologia dos vírus pertencentes a família *Potyviridae* tem sido obtido por meio da análise de transcrito, proteoma e metaboloma de hospedeiros durante o ciclo de infecção dos vírus, melhorando também o conhecimento das interações de proteínas vírus-hospedeiro e uma visualização mais abrangente do processo de infecção (Zerbini et al., 2009; Prasch e Sonnewald, 2013; Yang et al., 2007, 2011; Elena e Rodrigo, 2012).

1.3.1. Gênero *Potyvirus*

O gênero *Potyvirus* é o mais importante e numeroso dentre os gêneros pertencentes à família *Potyviridae*, pois infecta uma ampla variedade de plantas, tanto

monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, sendo assim o gênero responsável por grandes perdas econômicas. Devido a importância, seus estudos foram responsáveis pelo conhecimento de muitos aspectos gerais de toda virologia vegetal, como a caracterização funcional de proteínas virais, interação molecular de proteínas virais com proteínas do hospedeiro, taxonomia, evolução, epidemiologia e diagnose. Atualmente, aplicações biotecnológicas utilizando clones infectivos de *Potyvirus* estão sendo desenvolvidas (Revers e García, 2015). O avanço no conhecimento dos processos biológicos e molecular deste grupo de vírus é condição prévia para o desenvolvimento de estratégias de controle. As características dos gêneros pertencentes a família *Potyviridae* estão descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Característica dos gêneros da família *Potyviridae*.

Características	Descrição
Espécies Tipo de Cada Gênero	<i>Potato virus Y (Potyvirus)</i> ; <i>Sweet potato mild mottle virus (Ipomovirus)</i> ; <i>Ryegrass mosaic virus (Rymovirus)</i> ; <i>Wheat streak mosaic virus (Tritimovirus)</i> ; <i>Barley yellow mosaic virus (Bymovirus)</i> ; <i>Blackberry virus Y (Brambyvirus)</i> ; <i>Triticum mosaic virus (Poacevirus)</i> ; <i>Bellflower veinal mottle virus (Bevemovirus)</i> ; <i>Maclura mosaic virus (Macluraivirus)</i> ; <i>Rose yellow mosaic virus (Roymovirus)</i>
Vírus	Não-envelopado, capsídeo filamentosso e flexuoso, com 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 20 nm de diâmetro
Genoma	+ssRNA, com tamanho de 8 a 11 kb, Monopartido ou Bipartido
Replicação	No citoplasma, iniciado pela produção de vesículas no retículo endoplasmático induzidas pela proteína 6K2 formando o complexo de replicação viral
Tradução	Diretamente do RNA genômico
Hospedeiro	Plantas
Transmissão	Afídeos; Ácaros, Fungos (<i>Plasmodiophorales</i>); Mosca Branca
Taxonomia	10 Gêneros com 204 espécies descritas

Adaptado: (Adams et al., 2017)

1.3.2. Organização genômica e replicação

O genoma é composto de uma ou duas moléculas de RNA fita simples sentido positivo de até 11 kb em tamanho e protegido pela proteína da capa (CP). O RNA possui regiões não codificadoras denominadas de 5'UTR, onde uma VPg está ligada covalentemente, e de 3'UTR, que apresenta em sua extremidade uma cauda poli (A). O RNA codifica uma poliproteína que é auto-clivada, gerando um conjunto de proteínas funcionais importantes para o ciclo de replicação dos vírus. A disposição das proteínas é conservada entre membros desta família (Adams et al., 2017).

As regiões central e C terminal da poliproteína são observadas as proteínas P3-PIPO, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIaPro, NIb e CP, que são clivadas pela protease NIaPro (Antoniw, & Beaudoin, 2005; Atkins, & Firth, 2008). As duas proteases P1 e HC-Pro estão localizadas na parte N-terminal da poliproteína e se auto-clivam (Figura 1.3) (Adam et al., 2011). As funções dessas proteínas estão descritas resumidamente na Tabela 1.3.

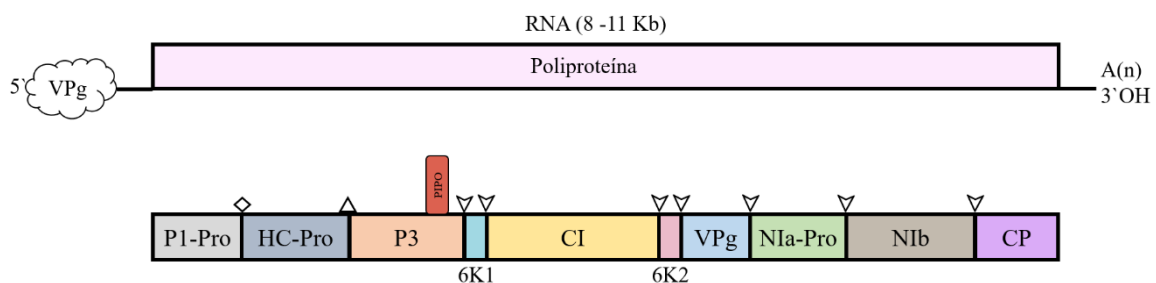


Figura 1.3: Mapa genômico do gênero *Potyvirus*. O genoma é monopartido, linear, composto por um +ssRNA de 10 kb em tamanho. Na extremidade 3' tem uma cauda poli (A) e na extremidade 5' possui uma proteína ligada ao genoma, a VPg.

△ Sítio de clivagem NIa-Pro

▽ Sítio de clivagem HC-Pro

◇ Sítio de clivagem P1-Pro

Adaptado: (Adams et al., 2017)

Tabela 1.3: Características e funções das proteínas codificadas por *Potyvirus*.

Proteínas	kDa	Função	Referência
P1	32-64	Serina Proteinase auto-clivagem C-terminal Patogenicidade Supressão do silenciamento gênico	Nagyová et al., 2012 Pesin et al., 2014
HC-Pro	56-58	Transmissão por afídeo Cisteína protease auto-clivagem C-terminal Movimento sistêmico Sinergismo com outros vírus Supressão do silenciamento gênico	Govier et al., 1977 Carrington et al., 1982 Jada e Lehto, 2011 Desbiez et al., 2010
P3	37	Patogenicidade Reconhecimento do hospedeiro Replicação viral	Luan et al., 2016 Cui et al., 2017 Kang et al., 2018
6K1	6	Replicação viral	Cui e Hang 2016
CI	70	ATPase/RNA helicase Replicação de RNA Movimento célula-célula Fator de virulência	Edwardson, 1966 Gabrenaitė et al., 2008 Fernandez et al., 1997 Sorel et al., 2014
6K2	6	Ligação ao complexo viral de replicação do genoma	Wei, et al., 2010
VPg	21-24	Iniciador de replicação do genoma; Interação com fatores de tradução eIF4E Supressão do silenciamento gênico	Jiang e Laliberté, 2011 Wang e Krishnaswamy, 2012
NIa-Pro	49	Serina Proteinase, clivagem da poliproteína em <i>cis</i> e <i>trans</i> Atividade DNase	Adams et al., 2005 Anindya e Savithri, 2004
NIb	58	RNA polimerase dependente de RNA Replicação do genoma	Hajimorad et al., 1996
CP	28-40	Transmissão por vetor Movimento viral Amplificação do genoma Encapsidação e montagem do vírus	Shukla e Ward, 1989 Bhat et al., 2013 Dombrovsky et al., 2005 Mahajan et al., 1996
PIPO		Movimento viral	King et al., 2012

Os *Potyvirus* se replicam em vesículas produzidas pela remodelagem das membranas do retículo endoplasmático (RE). Quase todas as proteínas desempenham um papel na replicação viral, exceto CP e PIPO que não desempenham um papel nesse processo (Grangeon, Jiang, et al., 2012). A replicação viral se inicia com a proteína 6K2, pela formação de vesículas que movimentam-se até os cloroplastos, onde é o local sugerido para replicação (Wei, Huang, et al., 2010) (Figura 1.4)

Além da proteína 6K2 que ancora na membrana do ER (Wei, Huang, et al., 2010), as principais proteínas envolvidas na replicação são a Nib, atua como uma RNA replicase, sendo assim uma RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) (Hung e Hunt, 1986), a CI, que vai atuar como uma helicase desnaturando regiões de fita dupla (Eagles et al., 1994), a VPg e a NIa, que interagem com o Nib, melhorando sua atividade e promovendo a iniciação ou um evento precoce relacionado à síntese do RNA (Fellers et al., 1998). A P3 está associada ao ER e com as vesículas produzidas pela proteína 6K2, entretanto a sua função nesse processo ainda precisa ser determinada (Kekarainen et al., 2002).

Segundo Cui e Hang (2016), a proteína 6K1 forma inclusões pontuais no estágio inicial da infecção viral e foi co-localizada com a replicase Nib. A proteína 6K2 também se associa aos cloroplastos, sugerindo que seja necessária para a replicação viral, sendo um elemento viral importante do complexo de replicação no estágio inicial da infecção. A HC-Pro, que está envolvida na supressão do silenciamento gênico, protege o RNA viral e seus intermediários replicativos não-encapsidados (Burgyán e Havelda, 2011). Entretanto, segundo Ala-Poikela e colaboradores (2011), a interação da proteína HC-Pro com as proteínas virais CI e VPg e proteínas vegetais eIF4E e eIF (iso) 4E (Fator de iniciação da tradução) sugerem que a HC-Pro esteja envolvida na replicação de *Potyvirus*. A P1 não é essencial para a replicação, sua atividade de protease não é essencial para a infectividade viral, mas é necessária para clivagem da HC-Pro, atuando como um acessório na amplificação do genoma (Verchot e Carrington, 1995a).

A presença de vesículas na membrana e as proteínas virais necessárias para a replicação (VPg–NIaPro, Nib, and CI), juntamente com fatores do hospedeiro indentificados por estarem envolvidos na síntese de proteínas virais (eIF4E, PABP, eEF1A, AtRH8 e HSP70/HSC70) indicam que a tradução do RNA viral e a replicação de potyvirus são eventos que acontecem simultaneamente (Figura 1.4; Hafrén et al., 2010;

Jiang e Liberté, 2011). Entretanto não se sabe ainda se a tradução ocorre no citoplasma ou dentro de vesículas Tendo em vista que a síntese de RNA viral e a tradução viral são processos que estão relacionados, as interações, sua regulação e o papel de fatores do hospedeiro envolvidos nesses processos precisam ser estudadas (Reves e García, 2015).

1.3.3. Movimento viral

Previamente ao processo de movimento, os vírus precisam assegurar as etapas de replicação e expressão, a fim de acumular quantidade suficiente de RNA e proteínas para promover sua permanência nas células infectadas e para viabilizar transmissão eficiente para outras células (Reves e Garcia, 2015).

No caso dos *Potyvirus*, o complexo replicativo se movimenta na célula utilizando os microfilamentos de actina, com envolvimento da miosina XI-K, e move-se através do plasmodesma para chegar nas células vizinhas, onde reinicia o processo de replicação (Ciu et al., 2010; Grangeon et al., 2012). As proteínas envolvidas no processo de movimento viral célula-a-célula são a CP, CI, PIPO e HC-Pro.

A região central e o C-terminal da CP e o N-terminal da CI são importante para o movimento célula-a-célula dos potyvirus (Seo et al., 2013). A CI forma estruturas cônicas correspondentes as inclusões cilíndricas. Esta estrutura foi observada atravessando o plasmodesma conectando células vizinhas (Roberts et al., 1998). A CP já foi observada próximo ou dentro dos cones formados pela CI e nas cavidades do plasmodesma, juntamente com o RNA que se associa a essas estruturas. Com isso, pode-se sugerir que a CI e a CP atuam na translocação do RNA viral através do plasmodesma. A CI, neste caso, pode posicionar a partícula viral ou Ribonucleoproteínas (RNA viral ligada a CP) para a translocação (Figura 1.4; Rodríguez-Cerezo et al., 1997). Entretanto, segundo Rojas e colaboradores (1997), somente a CP e a HC-Pro se movimentam, pois ambas são

capazes de aumentar o limite de exclusão do plasmodesma facilitando o movimento viral célula-a-célula (Rojas et al., 1997).

Vijayapalani e colaboradores (2012) demonstraram que a P3N-PIPO foi capaz de movimentar-se quando expressa sozinha sob o comando do promotor 35S em folhas de *N. benthamiana*, sugerindo que essa proteína poderia estar envolvida no movimento viral. A co-expressão da CI com a P3N-PIPO resultou na mudança de localização celular da CI (agregados no citoplasma), passando a localizar-se junto com a P3N-PIPO e a PDLP1 (Plasmodesmata-located protein 1) na parede celular (Thomas et al., 2008). Wei e colaboradores (2010) demonstraram a interação dessas duas proteínas por BiFC (Fluorescência Bimolecular Complementar), assim como o movimento da CI/P3N-PIPO através do plasmodesma, corroborando com os resultados demonstrados anteriormente (Wei et al., 2010).

Com isso, Reves e García (2015) propuseram um modelo de movimento célula-a-célula para os *Potyvirus*. O complexo CI/P3N-PIPO/6K2 é formado na membrana do retículo endoplasmático, induzindo estruturas perinucleares. O complexo movimenta-se utilizando as vias secretórias da célula e ancora no plasmodesma pela interação da PIPO com a proteína PCaP1 (Proteína de ligação a Cálcio associada a membrana), presente na membrana plasmática. Mais moléculas de CI se ligam ao complexo CI/P3N-PIPO, pois a CI tem a capacidade de interagir com ela mesma, formando as estruturas cônicas. A CP e as moléculas de RNA recém sintetizadas se deslocam ao longo dos microfilamentos em direção ao plasmodesma e se ligam nas estruturas cônicas, se movendo através do plasmodesma para as células vizinhas (Figura 1.4).

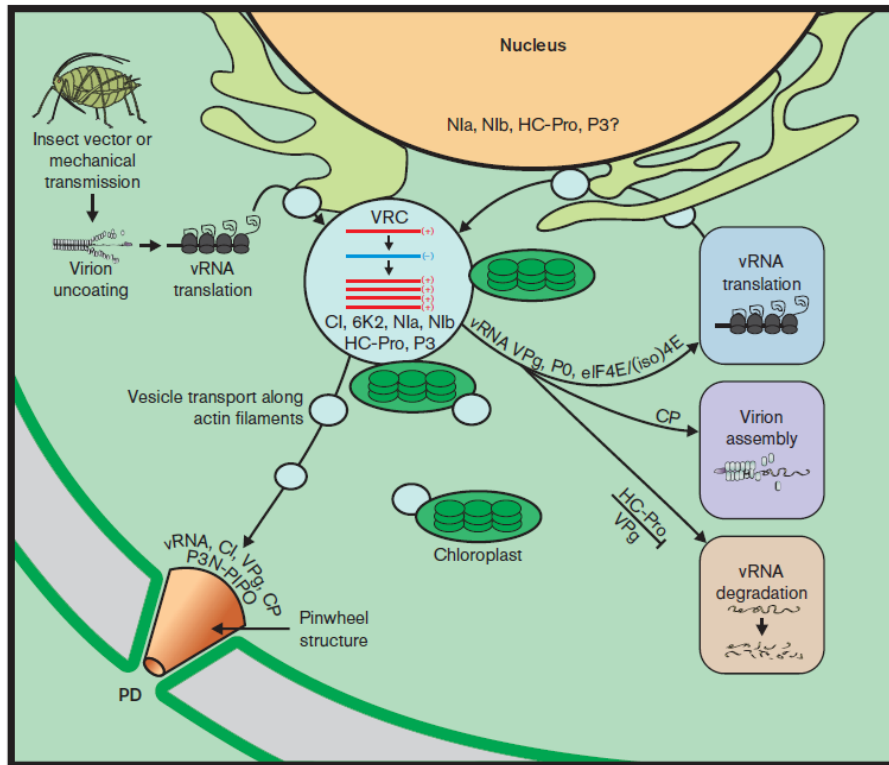


Figura 1.4. Representação esquemática dos principais eventos no ciclo de infecção por potyvirus. O vírus entra na célula hospedeira por inoculação mecânica através do inseto vetor, o pulgão. Após a desencapsidação, o RNA genômico é traduzido pelo ribossomo do hospedeiro em uma poliproteína que é posteriormente processada por três proteases virais (Nla-Pro, HC-Pro e P1-Pro). Pelo menos seis proteínas virais, CI, 6K2, Nla, Nib, HC-Pro e P3, estão envolvidos na replicação viral. Os potyvirus montam seus complexos de replicação (VRCs) como vesículas que ancoram as membranas do retículo endoplasmático usando componentes sequestrados da via secretora. Vesículas virais são transportadas ao longo de filamentos de actina em direção a parede celular e ao PD. Como um mecanismo alternativo, as vesículas virais são transportadas diretamente para as células vizinhas através do PD. Nas fases posteriores da infecção, as vesículas se fundem com membranas dos cloroplastos formando estruturas globulares perinucleares. Sugere-se que pelo menos quatro proteínas virais, CI, VPg, CP e P3N-PIPO, participam do movimento célula-célula que envolve a formação de estruturas tipo cata-vento pela proteína CI, associadas ao PD. Uma possibilidade é que o movimento célula-célula dos potyvirus ocorre na forma de complexos RNP. O RNA viral derivado do VRC pode ser traduzido e incorporado na progênie VRCs, permitindo que o RNA participe de novas rodadas de replicação viral, ou o RNA viral pode ser empacotado para a formação do virions ou direcionado à degradação (Ivanov et al., 2014).

1.3.4. Transmissão

As espécies de vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* são transmitidas naturalmente por afídeos, de maneira não persistente, isto é, não circulativo, requerendo assim, um período de aquisição curto de alguns segundos até poucos minutos. Dessa forma, o período de latência é ausente e período de retenção é curto, inferior a uma hora. Para esse tipo de transmissão, um período de jejum para a pré-aquisição aumenta a eficiência de transmissão. Já um período de aquisição superior a cinco minutos diminui esta eficiência (Hollings e Brunt, 1981). Para que ocorra a transmissão por afídeo, duas proteínas importantes são requeridas neste processo, a HC-Pro e a CP (Gal-on et al., 1992).

Análises experimentais e de comparação de sequências identificaram na HC-Pro dois motivos conservados tanto no N-terminal quanto no C-terminal da proteína importantes na transmissão por afídeo. O motivo KITC e o PTK se ligam ao virião e ao estilete do pulgão, fornecendo uma ponte para ligar as partículas do vírus ao pulgão (Pirone e Blanc, 1996). Um outro motivo importante foi encontrado na CP. O motivo DAG, identificado no N-terminal da CP, interage com o motivo PTK, favorecendo a transmissão (Blanc et al., 1998). Com isso, esses dados suportam um modelo “bridge”, no qual os motivos PTK e DAG determinam a interação de HC-Pro e CP, enquanto o motivo KITC medeia a interação do vírus com o estilete do pulgão (Ruiz-Ferrer et al., 2005).

1.3.5. *Johnsongrass mosaic virus*

O *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV; família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*) é uma espécie de potyvirus importante, causando sintomas de mosaico e intensa perda em produtividade em várias monocotiledôneas. JGMV foi primeiramente descrito como *Maize dwarf mosaic virus* (Shukla et al., 1987) e, logo após na Austrália, como *Sugarcane*

mosaic virus com base em propriedades biológicas e sorológicas (Taylor e Pares, 1968; Teakle e Grylls, 1973). Posteriormente, Shukla e Ward (1989) determinaram a sequência nucleotídica e aminoácidos da CP de JGMV, demonstrando que esse vírus era de fato uma nova espécie do gênero *Potyvirus*, sendo então renomeado como *Johnsongrass mosaic virus*. A ocorrência de JGMV foi relatada na Austrália (isolado JGMV-Jg; Karan et al., 1992; Gough e Shukla, 1993), Venezuela (isolado JGMV-Brac; Mariño et al., 2009), Colômbia (Morales et al., 1996), nos Estados Unidos (isolados JGMV-MDO e JGMV-KS1; McDaniel e Gordon, 1989) e no Brasil (isolado JGMV-Penni; Silva et al., 2013).

A sequência aminoácidos da CP de JGMV apresenta o motivo DAG, indicando que esse vírus pode ser transmitido por pulgões (Rybicki e Shukla 1992). Experimentalmente foi comprovado que quatro pulgões são responsáveis pela transmissão de JGMV: *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum maidis* (Teakle e Grylls, 1973).

Plantas de sorgo são normalmente suscetíveis a JGMV. Entretanto, a cultivar de sorgo denominada Krish possui um gene de resistência que confere resistência à esse JGMV-Jg. Por outro lado, o isolado de JGMV-KS1, originário dos Estados Unidos, é capaz de infectar plantas de sorgo da cultivar Krish. Tal isolado JGMV-KS1 foi caracterizado baseado na sequência da CP. Comparando a sequência de aminoácidos da CP do isolado JGMV-KS1 e JGMV-Jg, observou-se algumas divergências, tanto na extremidade N-terminal, quanto na parte central da CP. Divergências essas que podem ser responsáveis pela quebra de resistência em sorgo cv. Krish que carrega o gene de resistência JGMV-KS1 (Suranto et al., 1998).

1.4. Família *Secoviridae*

A família *Secoviridae* pertence a ordem *Picornavirales*, sendo constituída de espécies virais de RNA com partícula icosaédrica. A ordem *Picornavirales* é composta por famílias de vírus que infectam uma grande variedade de organismos, dentre eles os invertebrados (*Picornaviridae*), artrópodes (*Dicistroviridae*), insetos (*Iflaviridae*), algas (*Marnaviridae*) e plantas (*Secoviridae*) (Thompson et al, 2014; Le Gall O et al, 2008).

Atualmente, a família possui uma sub-família denominada de *Comovirinae*, que inclui os gêneros *Nepovirus*, *Comovirus* e *Fabavirus*, ademais, possui gêneros virais que até o momento não foram atribuídos uma sub-família, sendo eles os gêneros *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Torradovirus*, *Sequivirus* e *Waikavirus*. Os gêneros *Nepovirus*, *Comovirus*, *Fabavirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus* e *Torradovirus* apresentam genoma bipartido, isto é, possui dois segmentos genômicos. Por outro lado, os gêneros *Sequivirus* e *Waikavirus* apresentam genoma monopartido (Figura 1.5).

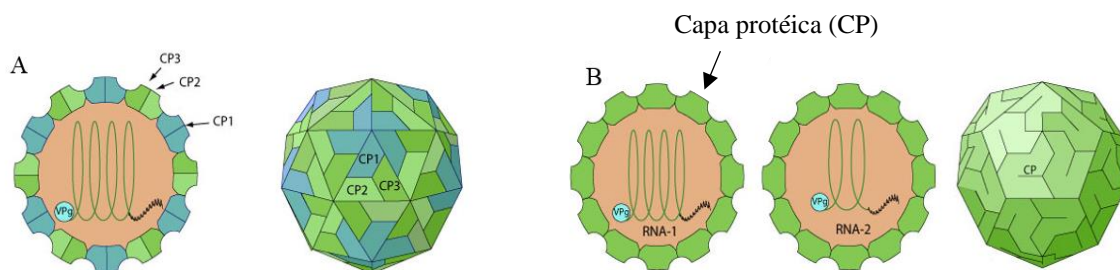


Figura 1.5: Desenho Esquemático de partícula viral icosaédrica característica de espécies da família *Secoviridae*. **A:** Partícula viral característica de vírus monopartido. **B:** Partícula característica de vírus bipartido. Fonte: Viralzone expasy

Os gêneros e espécies virais pertencente à família *Secoviridae* infectam exclusivamente plantas. São geralmente não-envelopados e seu genoma consiste em uma ou duas moléculas de +ssRNA, sendo que o tamanho é diferente para cada gênero. O RNA é monocistrônico, isto é, codifica apenas uma poliproteína (Thompson et al., 2017).

Possui uma extremidade 3' poliadenilada (cauda poli (A)), com exceção do gênero *Sequivirus*, que não possuem aparentemente poliadenilação. A extremidade 5' do RNA possui uma proteína VPg covalentemente ligada ao RNA (Sanfaçon et al., 2011). A família é caracterizada por possuir um número variado de capa proteica (CP), sendo que dependendo do gênero pode possuir de uma a três CPs (Figura 1.6; Sanfaçon et al, 2009; Sanfaçon et al, 2013).

As ORFs de vírus da família *Secoviridae* codificam uma poliproteína, que é clivada por proteases codificadas pelo próprio vírus, não havendo até o momento identificação de proteases do hospedeiro envolvidas neste processo (Le Gall et al., 2008). O RNA viral codifica proteínas conservadas e funcionais como a Helicase (HEL), a RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) e a 3C-like protease, formando o bloco de replicação viral (Sanfaçon et al, 2009). Cada segmento do genoma codifica uma poliproteína que é clivada pela cisteína protease 3C-protease, que é estruturalmente relacionada como Quimotripsina-like por parecer estruturalmente com a enzima Quimotripsina, que quebra ligações específicas de aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, triptofano e tirosina (Bazan e Letterick, 1988; Dougherty e Semler 1993; Gorbalenya et al, 1989; Sanfaçon et al, 2009).

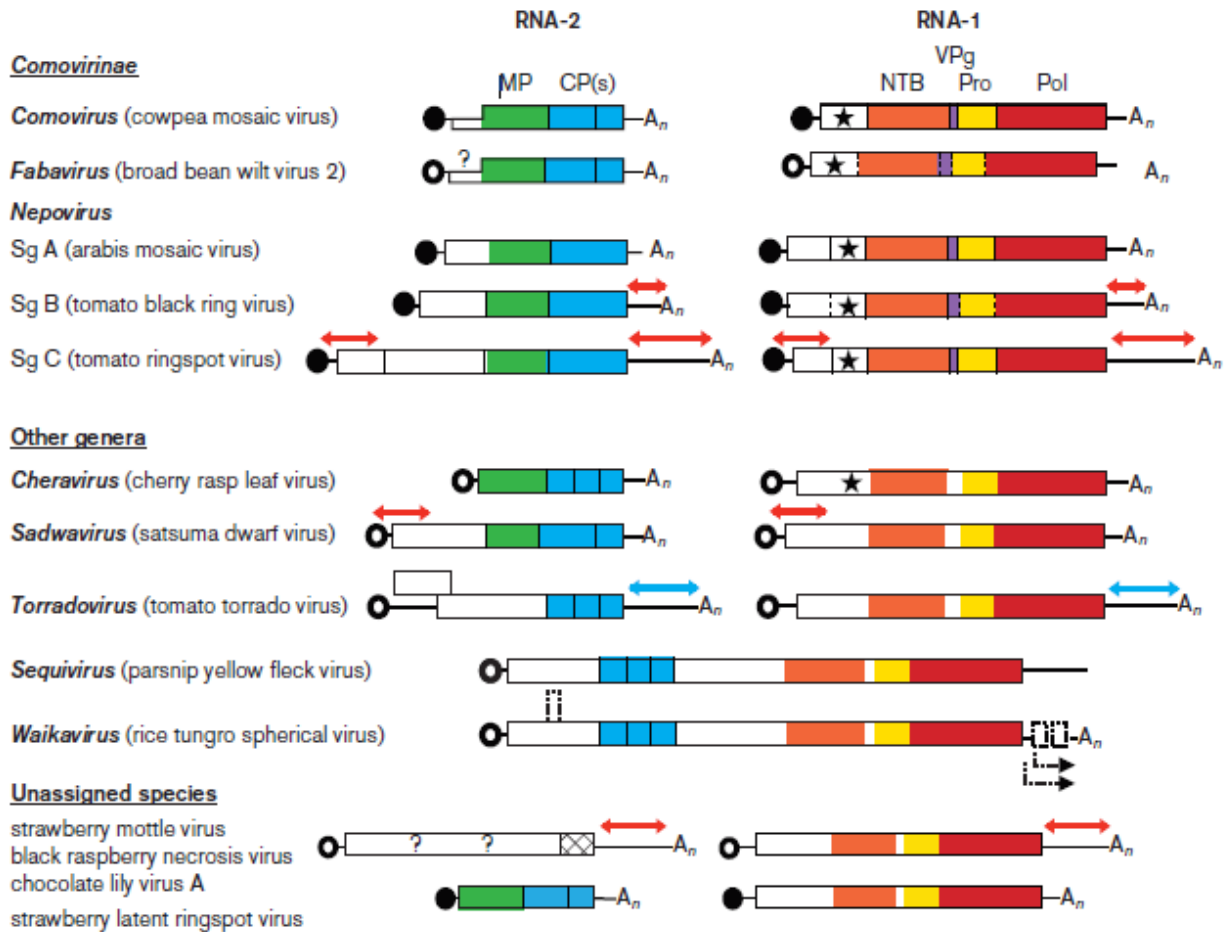


Figura 1.6: Organização genômica de membros representativos da família *Secoviridae*. A figura mostra gêneros com as respectivas espécies tipo entre parênteses. Cada RNA é mostrado com as ORFs representadas. Os círculos descrevem as moléculas de VPg covalentemente anexadas na extremidade de 5' dos RNAs. Os círculos negros representam as VPgs confirmadas experimentalmente e os círculos abertos representam VPgs preditas. As caudas de poliA são representadas na extremidade 3' dos RNA quando presentes como A_n . As setas vermelhas e azuis representam regiões de extensa identidade de sequência entre os RNAs 1 e RNA 2. Domínios proteicos com motivos conservados para a Helicase (mostrado em laranja), VPg (roxo), protease (Pro, amarelo), RNA-dependente de RNA polimerase (Pol, vermelho), proteína de movimento (MP, verde) e proteína (s) da Capa (CP, azul). A estrela representa um motivo conservado encontrado na protease (Co-Pro) de comovirus e na proteína equivalente de outros vírus. Sítios de clivagem de proteases identificadas experimentalmente ou deduzidos por comparações de sequências são indicadas por linhas verticais sólidas. Possíveis ORFs no genoma do gênero *Waikavirus* são mostrados com retângulos pontilhados e RNAs subgenômicos preditos são mostrados por setas pontilhadas abaixo do genoma do *Waikavirus*. Adaptado de Thompson et al., (2017)

1.4.1 Gênero *Waikavirus*

A organização genômica de *Waikavirus* é semelhante ao dos *Sequivirus*, exceto por apresentar pequenas ORF na extremidade 5' e na 3' do vírus, sobrepondo a poliproteína, mas em fase de leitura diferente. Essas pequenas ORFs foram detectadas no isolado MCDV-S de *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV), mas as análises das sequências nucleotídicas do genoma do MCDV não mostraram que estes RNAs podem ser subgenômicos (Reddick et al., 1997). Entretanto, segundo Shen e colaboradores (1993), para *Rice tungro spherical virus* (RTSV), a espécie tipo do gênero, há evidências experimentais que o RNA subgenômico é produzido em região da extremidade 3' do RNA. A presença da VPg ainda não foi confirmada para este gênero viral (Reddick et al., 1997).

Os hospedeiros dos *Waikavirus* são limitados a poucas famílias de plantas, não sendo transmitidos mecanicamente, o que dificulta a identificação de possíveis plantas hospedeiras. A transmissão dos vírus pertencentes a este gênero é de maneira semi-persistente, isto é, os vírus não circulam no inseto vetor, mas são transmitidos logo após a aquisição até por longos períodos, podendo ser transmitidos tanto por afídeo como por cigarrinha (Cassone et al., 2014). Há indícios de que os *Waikavirus* podem auxiliar na transmissão de outro vírus pelo inseto vetor, como no caso do *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV), um *Sequivirus* que é transmitido para *Anthriscus sylvestris* somente na presença do *Waikavirus Anthriscus yellows virus* (AYV), e no caso de *Rice tungro bacilliform virus*, que somente foi capaz de ser transmitido para plantas de arroz pela cigarrinha *Nephotettix virescens* na presença do *Waikavirus Rice tungro spherical virus* (Hibino., 1993; Murrant e Gould, 1968). Até o momento, apenas 4 espécies foram aceitas pelo comitê taxonômico de vírus pertencentes a esse gênero estão descritas na Tabela 1.4.

Tabela 1.4: Espécies de vírus pertencentes ao gênero *Waikavirus* aceitas pelo comitê taxonômico de vírus (ICTV)

Nome do vírus	Abreviação	GenBank
<i>Rice tungro spherical virus</i>	RTSV	NC-001632
<i>Maize chlorotic dwarf virus</i>	MCDV	NC-003626
<i>Anthriscus yellows virus</i>	AYV	Não tem número
<i>Bellflower vein chlorosis virus</i>	BVCV	NC-027915

O *Rice tungro spherical virus* causa a doença importante na cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) (Shen et al., 1993). Por muitos anos este vírus causou perdas nesta cultura em países do sul e sudeste da Ásia, onde existe uma grande produção de arroz, pois a etiologia desta doença ainda era desconhecida. Somente em 1960, devido ao aumento da incidência de doenças na cultura, e a falta de conhecimento deste novo tipo de interação, muitos grupos de pesquisas começaram a estudar essa doença. Já nessa época, observou-se a presença de partículas virais em plantas doentes e a grande incidência de cigarrinha nestas plantas. Em 1978, a presença de sintomas em plantas de arroz foi associada à presença de dois vírus, o *Rice tungro spherical virus* (*Waikavirus*) e o *Rice tungro bacilliform virus* (*Pararetrovirus*), sendo os dois transmitidos pela cigarrinha *Nephotettix virescens*. A partir da identificação dos agentes etiológicos, a doença foi denominada de “Rice tungro Disease” (RTD) (Shen et al., 1993).

O vírus *Bellflower vein chlorosis virus* foi encontrado infectando plantas de Flor-de-Sino (*Campanula* spp.) na Coreia em 2014. Flor-de-Sino é uma planta ornamental perene comumente cultivada em todo mundo. Sintomas de clorose nas veias e amarelecimento foram observados em folhas infectadas. O genoma completo deste vírus foi determinado pelo sequenciamento em larga escala, utilizando a plataforma Illumina TruSeq. O genoma é correspondente as espécies pertencentes ao gênero *Waikavirus*,

sendo assim composto por +ssRNA monopartido com 11.649 nucleotídeos. A poliproteína codificada possui identidade máxima de 42% da sequência de aminoácido com a poliproteína de *Rice tungro spherical virus*. A análise filogenética mostrou que o BVCV é mais relacionado com o cluster RTSV, junto com os membros do gênero *Waikavirus*. Com a análise filogenética e a análise da sequência completa do genoma, sugere-se que este vírus pertença a este gênero, sendo assim o primeiro relato deste vírus (Seo et al., 2015).

Anthriscus yellows virus foi isolado pela primeira vez de *Anthriscus sylvestris* por Murant e Goold (1968), sendo transmitido pelo afídeo *Cavariella aegopodii* de forma semi-persistente e auxiliando diretamente na transmissão de *Parsnip yellow fleck virus* (PYFV) (Elnagar e Murant, 1976). Os únicos hospedeiros descritos até o momento para este vírus foram *Anthriscus sylvestris*, *Anthriscus cerefolium* e *Coriandrum sativum* (Murant e Goold., 1968). A sequência nucleotídica deste vírus ainda não foi determinada.

1.4.2. Maize chlorotic dwarf virus

Na década de 60's, várias doenças viróticas apareceram infectando milho no sudeste dos Estados Unidos, onde existia uma ampla distribuição de cigarrinhas, causando danos econômicos aos produtores. Entre elas estava uma doença que era denominada de "agente do nanismo", transmitida pela cigarrinha *Graminella nigrifons* (Nault et al., 1973). Em meados da década de 70's esta doença foi amplamente distribuída no oeste do Texas, no Golfo do México e no sul de Ohio (Gordon et al., 1977). No ano de 1972 e 1973 foram identificadas partículas virais em plantas de milho infectadas e associadas com a transmissão por cigarrinha. No mesmo ano, um vírus foi identificado como o causador da doença, sendo denominado de *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) (Nault e Madden, 1988).

O vírus foi originalmente identificado e descrito pela primeira vez em Ohio no ano de 1969 por Rosenkranz (Rosenkranz., 1969; Stewart et al., 2011). Atualmente, os quatro isolados de MCDV existentes foram descritos de acordo com a sintomatologia, sorologia e localização geográfica, são eles MCDV-M1 (isolado fraco- AY829112) (Hunt et al., 1988), MCDV-TN (isolado do estado de Tennessee- U67839) ou isolado MCDV-T (Isolado tipo) (Mcmullen et al. 1996; Reddick et al., 1997), MCDV-OH (Reddick et al., 1997) e MCDV-S (Isolado severo- AY36255) (Chaouch et al., 2004). No ano de 2017, foi demonstrada pela primeira vez a função da proteína P1 ou R78 de MCDV como sendo supressora de silenciamento gênico (Stewart et al., 2017). Entretanto, pouco se conhece a respeito das funções das proteínas expressas pelo vírus do gênero *Waikavirus*.

A transmissão deste vírus é realizada pela cigarrinha *Graminella nigrifrons* (Hamada et al., 2004). Para ser transmitido por inseto, esse vírus necessita de uma proteína denominada como componente auxiliar (HC). Evidências de que este componente não faz parte do genoma viral do MCDV foram relatadas (Stewart et al., 2011). Entretanto, purificados do isolado MCDV-S e MCDV-M1 foram transmitidos por cigarrinha após a alimentação de plantas de milho infectada com os vírus (Cremer et al., 1993). A observação de uma matriz de partícula viral no estômago da cigarrinha *G. nigrifrons* levou a sugerir que esta matriz pode conter o componente auxiliar permitindo que o vírus seja retido e transmitido pelo vetor (Steven et al., 1988). Em 2004 experimentos avaliando o acúmulo de proteínas virais do MCDV em cigarrinha, o anticorpo para a proteína R78 detectou a proteína P25 em cigarrinhas virulíferas, mas não em cigarrinhas que se alimentaram de plantas saudáveis, levando a considerar que a P25 poderia ser a proteína HC do MCDV. O suporte de que a P25 poderia ser o componente auxiliar do MCDV veio devido a não detecção da proteína em cigarrinhas após o período de 48 h de aquisição, correspondente com a falta de transmissão contínua do MCDV por

G. nigrifrons por cerca de 48 h após a aquisição do vírus (Cremer et al., 1993; Chaouch-Hamada et al., 2004). A cigarrinha *G. nigrifrons* transmite os 4 isolados descritos de MCDV (MCDV-S, MCDV-TN ou MCDV-T, MCDV-OH e MCDV-M1), sugerindo uma certa conservação no inseto vetor responsável pela transmissão (Reddick et al., 1997; Gingery e Nault, 1990; Nault et al., 1973; Chaouch-Hamada. et al., 2004). Adicionalmente são necessárias pesquisas para elucidar o mecanismo de ação para HC do MCDV (Chaouch-Hamada et al., 2004).

Santa-Cruz e colaboradores (1993) observaram que os vírus pertencentes a esse gênero estão limitados ao floema do tecido vegetal. Entretanto, o MCDV já foi observado no mesófilo. Estudos comparativos usando estirpe mais fraca (MCDV-M1) e mais forte (MCDV-T) revelaram a presença desses vírus no parênquima vascular e no floema (Fith e Atkins, 2008).

1.5. Objetivos do trabalho proposto

Nos últimos anos, tem sido relatado frequentemente em campo de plantas forrageira a ocorrência de sintomas típicos de infecções virais como mosaico, amarelecimento generalizado e nanismo em diversas forrageiras. Essas ocorrências indicam a possível presença de patógenos virais em áreas de pastagens naturais ou cultivadas. A alta severidade de doenças viróticas observadas em plantas forrageiras, aliada a falta de conhecimento dos agentes etiológicos de doenças virais nesse grupo de plantas no Brasil, demonstram a necessidade de se realizar um levantamento desses patógenos em áreas de pastagens. Além disso, o conhecimento dos mecanismos de ação do processo de infecção desses vírus é essencial para o desenvolvimento de medidas protetivas e de estratégias de controle da infecção. Nesse contexto, o objetivo do trabalho proposto foi:

1. Caracterização biológica e molecular de *Johnsongrass mosaic virus* identificado no sequenciamento de alto desempenho.
2. Caracterização molecular de *Maize chlorotic dwarf virus* identificado no sequenciamento de alto desempenho.
3. Co-localizar as proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 de MCDV com marcadores de organelas visando inferir funções biológicas dessas proteínas no processo infectivo.

1.6. Referência bibliográfica

- ABIEC. Exportações brasileiras de carne bovina fecham 2018 com recorde histórico. <http://www.abiec.com.br/download/exportacoes%20fecham%20com%20recorde.pdf> [Acesso, 10 out 2019], 2019
- ABIEC. Brasil lidera ranking de exportação de carne bovina [online]. Disponível em: http://www.abiec.com.br/news_view.asp?id=%7BCAACE975-B5D1-4337-9F3B580E7118CB45%7D, [Acesso 29 ago 2013], 2009.
- ADAMS, M.J.; ZERBINI, F.M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D.C.; VALKONEN, J.P.T. Virus Taxonomy. Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. New York: Academic Pres, 1327 p., 2011.
- ADAMS, M.J.; ZERBINI, F.M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D.C.; VALKONEN, J.P.T. Virus Taxonomy. Ten Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. New York: Academic Pres, 1327 p., 2017.
- ALA-POIKELA, M; GOYTIA, E; HAIKONEN, T; RAJAMAKI, M.-L; VALKONEN, J. P. T. Helper component proteinase of genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E that contains a 4E binding motif. *Journal of Virology*, 85, 6784–6794. 2011
- ANDRADE, C.M.S.; VALENTIM, J.F. Recuperação da capacidade produtiva de uma pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com adubação nitrogenada ou fosfatada. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA (CD-ROM). Campo Grande. Anais. Campo Grande: SBZ/ Embrapa Gado de Corte, 2004.
- ANINDYA, R; SAVITHRI, H. S. Potyviral NIa proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 32159-32169.2004.
- ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B.; CAMPOS, P.R.S.S. Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras Tropicais no Brasil. *Archivos de Zootecnia*, v. 57 (R): p. 61-76, 2008.
- ARANOVICH, S. O capim colômbio e outras cultivares de *Panicum maximum* Jacq.: Introdução e evolução do uso no Brasil. In: Simpósio sobre Manejo da Pastagem, 12, Piracicaba. Anais. FEALQ. Piracicaba. p.1-20, 1995.
- BHAT, S., FOLIMONOVA, S. Y., COLE, A. B., BALLARD, K. D., LEI, Z., WATSON, B. S. (2013). Influence of host chloroplast proteins on Tobacco mosaic virus accumulation and intercellular movement. *Plant Physiology*, 161, 134–147.
- BAZAN, J.F; FLETTERICK, R.J. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 85, p. 7872-7876, 1988.
- BLANC, S.; AMMAR, E. D.; GARCIA-LAMPASONA, S.; DOLJA, V. V.; LLAVE, C.; BAKER, J.; PIRONE, T. P. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interaction with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.*, v. 79, p. 3119-3122, 1998.
- BROWN D, J.F.; HALBRENDT J.M.; ROBBINS R.T.; VRAIN T.C. Transmission of Nepoviruses by *Xiphinema americanum*-group Nematodes. *Journal of Nematology*, v. 25, n. 3, p. 349-354, 1993.
- BURGYAN, J; HAVELDA, Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science*, 16, 265–272. 2011
- CARETTE, J.E.; VAN LENT, J.; MACFARLANE, S.A.; WELLINK, J.; VAN KAMMEN, A. Cowpea mosaic virus 32- and 60-kilodalton replication proteins target and change the morphology of endoplasmic reticulum membranes. *Journal of Virology*, v. 76, p. 6293-6301, 2002.

- CARVALHO, C.M.; WELLINK, J.; RIBEIRO, S.G.; GOLDBACH, R.W.J; LENT, W.M.VAN. The C-terminal region of the movement protein of Cowpea mosaic virus is involved in binding to the large but not to the small coat protein. *Journal of General Virology*, 84, 2271–2277. 2003.
- CHAOUCH-HAMADA, R.; REDINBAUGH, M.G.; MARRAKCHI, M.; HOGENHOUT, S.A. Genomics of the severe isolate of *Maize chlorotic dwarf virus*. *Plant Protection Science*, v. 40, p.113-119, 2004.
- CREAMER, R.; NAULT, L.R.; GINGERY, R.E. Biological factors affecting leafhopper transmission of purified maize chlorotic dwarf machlovirus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 67, p. 65-71, 1993.
- CUI.X; YAGHMAIEAN. H; WU. G; WU. X; CHEN. X; THORN. G. WANG. A. The C-terminal region of the *Turnip mosaic virus* P3 protein is essential for viral infection via targeting P3 to the viral replication complex. *Virology*. 510, 147-155. 2017
- CUI H, WANG A. Plum pox virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection. *J Virol* 90:5119 –5131. 2016
- DOMBROVSKY, A., HUET, H., CHEJANOVSKY, N., & RACCAH, B. Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Archives of Virology*, 150, 287–298. 2005
- DOUGHERTY, W.G.; SEMLER, B.L. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews*, v. 57, p. 781-822, 1993.
- ELENA, S.F; RODRIGO, G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Current Opinion in Virology*, v. 2, p. 719-724, 2012.
- ELNAGAR, S.; MURANT, A.F. Role of helper virus, anthriscus yellows, in transmission of parsnip yellow fleck virus by aphid *Cavariella aegopodii*. *Annals of Applied Biology*, v. 84, p.169-181, 1976.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Academic Pres.1259 p. 2005.
- FERRAZ, J. B. S; FELÍCIO, P. E. D. Production systems - an example from Brazil. *Meat Science*, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.
- FERNANDEZ, A., GUO, H. S., SAENZ, P., SIMON-BUELA, L., GOMEZ DE CEDRON, M., GARCIA, J. A. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Research*, 25,4474–4480.1997.
- FIRTH, A.; ATKINS, J.F. Bioinformatic analysis suggests that a conserved orf in the waikaviruses encodes an overlapping gene. *Archives of Virology*, v. 153, p. 1379-1383, 2008.
- FUCHS, M.; SCHMITT-KEICHINGER, C.; SANFAÇON, H. A renaissance in nepovirus research provides new insights into their molecular interface with hosts and vectors. *Advances in Virus Research*, v. 97, 2017.
- GABRENAITE-VERKHOVSKAYA, R., ANDREEV, I. A., KALININA, N.O., TORRANCE, L., TALIANSKY, M. E., MAKINEN, K. Cylindrical inclusion protein of potato virus A is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *Journal of General Virology*, 89,829–838.2008
- GAL-ON, A.; ANTIGNUS, Y.; ROSNER, A.; RACCAH, B. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 2183-2187, 1992.
- GINGERY, R. E.; NAULT, L.R. Severe maize chlorotic dwarf disease caused by double infection with mild virus strains. *Phytopathology*, v. 80, p. 687-691, 1990.

- GORBALENYA, A.E.; DONCHENKO, A.P.; BLINOV, V.M.; KOONIN, E.V. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Letters*, v. 243, p. 103-114, 1989.
- GORDON, D.T.; NAULT, L.R. Involvement of maize chlorotic dwarf virus and other agents in stunting diseases of *Zea mays* in United States. *Phytopathology*, v. 67, p. 27-36, 1977.
- GOUGH, K.H.; SHUKLA, D.D. Nucleotide sequence of Johnsongrass mosaic Potyvirus genomic RNA. *Intervirology*, v. 36, p.181-192, 1993.
- HANSEN, A.J.; NYLAND, G.; MCELROY, F.D.; STACESMI, R. Origin, cause, host range and spread of cherry rasp leaf disease in North America. *Phytopathology*, v. 6, n. 4, p. 721-727, 1974.
- HAFREN, A.; HOFIUS, D.; RONNHOLM, G.; SONNEWALD, U.; MAKINEN, K. HSP70 and its cochaperone CPIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *The Plant Cell*, 22, 523–535. 2010.
- HERLING, V.R.; BRAGA, G.J.; LUZ, P.H.C.; OTANI, E.L. Tobiata, Tanzânia e Mombaça. In: Simpósio sobre Manejo da Pastagem, 17, Piracicaba. Anais. FEALQ. Piracicaba. p. 89-132, 2001.
- HIBINO, H. Transmission of Rice Tungro-Associated Viruses and Rice Waikavirus from Doubly or Singly Infected Source Plants by Leafhopper Vectors. *Plant Dis* 67, 774-777, 1983.
- HOLLINGS, M.; BRUNT, A.A. Potyviruses. In: Kurstak, E. Hand-book of plant virus infections comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland, p. 731-807, 1981.
- HUNT, R.E.; NAULT, L.R.; GINGERY, R.E. Evidence for infectivity of Maize chlorotic dwarf virus and for a helper component in its leafhopper transmission. *Phytopathology*, v. 78, p. 499-504, 1988.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [online]. Produção da Pecuária Municipal. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. [Acesso 07 ago 2017], 2017 (a).
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [online]. Censo Agropecuário. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro_2017_resultados_preliminares.pdf [Acesso 07 ago 2017], 2017 (b).
- JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., Piracicaba. Anais. Piracicaba: FEALQ, p. 21-58, 1995.
- JANK, L.; RESENDE, R.M.S; VALLE, C.B. do. Melhoramento genético de *Panicum maximum*. In: RESENDE, R.M.S; VALLE, C.B. do; JANK, L. (Ed.) Melhoramento de forrageiras tropicais. 1.ed. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, p. 55-87, 2008.
- JIANG, J; LALIBERTE, J-F. The genome-linked protein VPg of plant viroses a protein with many partners. *Current Opinion in Virology*, 1, 347–354.2011
- KANG, B; PENG, B; WU, H; LIU, L; WU, W; GU, Q. Host-associated selection of a P3 mutant of zucchini yellow mosaic virus affects viral infectivity in watermelon. *Archives of Virology* 163:1449–1454.2018
- KARAN, M.; NOONE, D.F.; TEAKLEAD, D.S.; HACKER, J.B. Susceptibility of pearl millet accessions and cultivars to Johnsongrass mosaic and sugarcane mosaic viruses in Queensland. *Australasian Plant Pathology*, v. 21,1992.
- LAPIERRE, A.; SIGNORET, P.A. *Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Gramineae)*. Science Pub Inc. illustrated edition, December 30. 852 p., 2004.

- LE GALL, O.; CHRISTIAN, P.; FAUQUET, C.M.; KING, A.M.; KNOWLES, N.J. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T =3 virion architecture. *Archives of Virology*, v. 153, p. 715-727, 2008.
- LOMONOSSOFF, G.P.; JOHNSON, J.E. The synthesis and structure of comovirus capsids, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 55, n. 2, p. 107-137, 1991.
- LUAN. H; SHINE. M.B; CUI. X; CHEN. X; MA. N; KACHROO. P; ZHI. H; KACHROO. A. The Potyviral P3 Protein Targets Eukaryotic Elongation Factor 1A to Promote the Unfolded Protein Response and Viral Pathogenesis. *Plant Physiol. Sep*;172(1):221-34. 2016.
- MARCHI, C.E.; FERNANDES, C.D.; VERZIGNASSI, J.R. Doenças em plantas forrageiras. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, ISSN 1983-974, 2011.
- MARIÑO, A.A.; GARRIDO, M.J.; ASCANIO, A. Reaccoín de cultivares de maíz al Potyvirus del mosaic del pasto Johnson. *Fitopatologia Venezuela*, v. 35, 2009.
- MAHAJAN, S., DOLJA, V. V., & CARRINGTON, J. C. Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology*, 70, 4370–4379.1996.
- MCDANIEL, L.L.; GORDON, D.T. Identification of a new strain of maize dwarf mosaic virus. *Plant Disease*, v. 69, p. 602-607, 1985.
- MCMULLEN, M.D.; ROTH, B.A.; TOWNSEND, R. Maize chlorotic dwarf virus and resistance thereto. USA patent 5569828. U.S. Patent Office, Washington, DC. 1996.
- MENZEL, W; VETTEN, H.J. Complete nucleotide sequence of an isolate of the Anthriscus strain of Parsnip yellow fleck virus. *Archives of Virology*, v.153, p. 2173-2175, 2008.
- MORALES, F.J.; OSPINA, M.D.; CASTANO, M.; CALVERT, L.A. Sequence analysis of the genomic RNA 3'terminal region of a Potyvirus from *Brachiaria* spp. related to guineagrass mosaic virus. *Journal of Phytopathology*, v. 144, n. 9-10, p. 485-489, 1996.
- MURANT, A.F; GOULD, R.A. Purification, properties and transmission of parsnip yellow fleck, a semi-persistent, aphid-borne virus. *Annals of Applied Biology*, v. 62, p. 123-137, 1968.
- MURANT, A.F.; ROBERTS, I.M.; HUTCHESON, A.M. Effects of parsnip yellow fleck virus on plant-cells. *Journal of General Virology*, v. 26, p. 277-285, 1975.
- MUSHEGIAN, A.R. The putative movement domain encoded by nepovirus RNA-2 is conserved in all sequenced nepoviruses. *Archives of Virology*, v. 135, p. 437-441, 1994.
- NAGYOVÁ. A; KAMENCAJOVÁ. M; GLASA. M; SUBR. Z. W. The 30 -proximal part of the Plum pox virus P1 gene determinates the symptom expression in two herbaceous host plants. *Virus Genes* (2012) 44:505–512. 2012.
- NAULT, L.R.; STYER, W.E.; KNOKE, J.K.; PITRE, H.N. Semipersistent transmission of leafhopper-borne Maize chlorotic dwarf virus. *Journal of Economic Entomology*, v. 66, p. 1271-1273, 1973.
- NAULT, L.R.; MADDEN, L.V. Phylogenetic relatedness of maize chlorotic dwarf virus leafhopper vectors. *Phytopathology*, v. 78, p.1683-1687, 1988.
- OTERO, J.R. Informações sobre algumas plantas forrageiras. 2.ed. Rio de Janeiro: SAI, 1961.
- PARSONS, J.J. Spread of African grasses to the American Tropics. *J. Range Manage.*, v. 25, p. 12-17, 1972.
- PRASCH, C.M.; SONNEWALD, U. Simultaneous application of heat, drought, and virus to Arabidopsis plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiology*, v. 162, p. 1849-1866, 2013.

- PIRONE, T. P; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol*, v. 34, p. 227-247, 1996.
- REDDICK, B.B.; HABERA, L.F.; LAW, M.D. Nucleotide sequence and taxonomy of Maize chlorotic dwarf virus within the family Sequiviridae. *Journal of General Virology*, v. 78, p.1165-1174, 1997.
- REVERS. F; GARCÍA. J.A. Molecular biology of potyviruses. *Advances in Virus Research*, v 92, 2015, p.101-199, 2015
- ROBERTS. I. M; WANG,.D; FINDLAY. K; MAULE. A. J. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology*, 245, 173–181, 1998.
- RODRIGUEZ-CEREZO. E; AMMAR, E; PIRONE. E. D; SHAW. J. G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology*, 74, 1945–1949, 1993.
- ROJAS, M. R; ZERBINI, F. M; ALLISON, R. F; GILBERTSON, R. L; LUCAS, W. J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, 237, 283–295, 1997.
- RUIZ-FERRER, V; BOSKOVIC, J; ALFONSO, C; RIVAS, G; LLORCA, O; LOPEZ-ABELLA, D. Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-Pro oligomers involved in aphid transmission. *Journal of Virology*, 79, 3758–3765, 2005.
- RYBICKI, E.P.; SHUKLA, D.D. Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. In: Barnett OW(ed), *Potyvirus taxonomy*. *Archives of Virology*, v. 5, p. 139-170, Springer, Wien New York. 1992.
- SANFAÇON, H. Investigating the role of viral integral membrane proteins in promoting the assembly of nepovirus and comovirus replication factories. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, article 313, 2013.
- SANFAÇON, H.; WELLINK, J.; LE GALL, O.; KARASEV, A.; VAN DER VLUGT, R.; WETZEL, T. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Arch. Virol.* 154, 899–907, 2009.
- SANTA-CRUZ, F.C.; BOULTON, M.I.; HULL, R.; AZZAM, O. Agroinoculation allows the screening of rice for resistance to rice tungro bacilliform virus. *Journal of Phytopathology* v. 147, p. 653-659, 1999.
- SEO, J.K.; KWAK, H.R.; LEE, Y.J.; KIM, J.; KIM, M.K.; KIM, C.S.; CHOI, H.S. Complete genome sequence of bellflower vein chlorosis virus, a novel putative member of the genus Waikavirus. *Archives of Virology*. Springer, 2015.
- SHEN, P.; KANIEWSKA, M.; SMITH, C.; BEACHY, R.N. Nucleotide sequence and genomic organization of Rice tungro spherical virus. *Virology*, v. 193, p. 621-630, 1993.
- SHUKLA, U.C.; RAJ, H. Relative response of corn (*Zea mays* L.), pearl-millet (*Pennisetum typhoides*). *Journal of Plant Nutrition*, v. 10, p. 2057-2067, 1987.
- SHUKLA, D.D; LAURICELLA, R; WARD, C.W. Serology of Potyviruses: current problems and some solutions. In: BARNETT, O. W. *Potyvirus Taxonomy*, Springer, Wien and New York. *Archives of Virology*, v. 5, p. 31-46. 1992.
- SHUKLA, D. D.; WARD, C.W. Structure of *Potyvirus* coat proteins and its application in the taxonomy of the *Potyvirus* group. *Adv Virus Res*, v. 36, p. 273-314, 1989.
- SILVA, K.N.; NICOLINI, C.; SILVA, M.S.; FERNANDES, C.D.; NAGATA, T.; RESENDE, R.O. First report of Johnsongrass mosaic virus (JGMV) infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil. *Plant Disease*, v. 97, n. 7, p.1003, July 2013. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0013-PDN>.

- SOREL, M., GARCIA, J. A., & GERMAN-RETANA, S. The Potyviridae cylindrical inclusion helicase: A key multipartner and multifunctional protein. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 27, 215–226.2014.
- SOUZA, F.H.D.; POTT, E.B.; PRIMAVES, O.I.; BERNARDI, A.C.C.; RODRIGUES, A. Usos alternativos da palhada residual da produção de sementes para pastagens. 1ª ed. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos. SP. v. 1, 241 p., 2006.
- STEVEN, A.; KERRY, C.; HARRIS, F. Localization of virus-like particles in the foreguts of viruliferous *Gramineila nigrifrons* leafhoppers carrying the semi-persistent maize chlorotic dwarf virus. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 247-251, 1989.
- STEWART, L.R. Waikaviruses: Studied but not understood. APS Features. doi:10.1094/APSFeature-2011-11, 2011.
- STEWART, L.R.; JARUGULAB, S.; ZHAOB, Y.; QUB, F.; MARTYA, D. Identification of a maize chlorotic dwarf virus silencing suppressor protein. *Virology*, v. 504, p. 88-95, 2017.
- STEWART, L.R.; BOUCHARD, R.; REDINBAUGH, M.G.; MEULIA, T. Complete sequence and development of a full-length infectious clone of an Ohio isolate of Maize dwarf mosaic virus (MDMV). *Virus Research*, v. 165, p. 219-224, 2012.
- SURANTO, S.; GOUGH, K.H.; SHUKLA, D.D.; PALLAGHY, C.K. Coat protein sequence of Krish infecting strain of Johnsongrass mosaic Potyvirus. *Archives of Virology*, v. 143, p. 1015-1020, 1998.
- TAYLOR, R.H.; PARES, R.D. The relationship between sugarcane mosaic virus and mosaic virus maize and Johnson grass in Australia. *Australian Journal of Agriculture Research*, v. 19, p. 767, 1968.
- TEAKLE, D.S.; GRYLLES, N.E. Four strains of sugarcane mosaic virus infecting cereals and other grasses in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*. v. 24, p. 465-477, 1973.
- THOMAS, C. L; BAYER, E. M; RITZENTHALER, C; FERNANDEZ-CALVINO, L; MAULE, A. J. Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biology*, 6, e7, 2008
- THOMPSON, J.R.; KAMATH, N.; PERRY, K.L. An evolutionary analysis of the Secoviridae family of viruses. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, e106305, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0106305.
- THOMPSON, J.R.; DASGUPTA, I.; FUCHS, M.; IWANAMI, T.; KARASEV, A.V.; PETRZIK, K.; SANFAÇON, H.; TZANETAKIS, I.E.; VAN DER VLUGT, R.; WETZEL, T.; YOSHIKAWA, N. ICTV Virus Taxonomy Profile: Secoviridae, *Journal of General Virology*, v. 98, p. 529-531, 2017.
- VALLE, C.B.; EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; VALÉRIO, J.R.; CALIXTO, S. Selecting new *Brachiaria* for Brazilian pastures. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, Anais. São Pedro: FEALQ. CD-ROM. ID. 13-14, 2001.
- VAN DER VLUGT, R.A.A.; MARTIN, V.; ANNETTE, M.D.; WILLIAM, M.W.; WILMER, J.C.; ADRIAN, F.; THOMPSON, J.R. Torradoviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 53, p. 485-512, 2015.
- VAN LENT JWM, STORMS M, VAN DER MEER F, WELLINK J, GOLDBACH RW. Tubular structures involved in movement of Cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *J Gener Virol* 72:2615–2623.1991.
- VERZIGNASSI, J.R.; FERNANDES, C.D. Doenças em forrageiras [online]. Campo Grande, MS, Embrapa Gado de Corte, ISSN 1516-5558. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD50.html> [Acesso 23 mar 2014], 2001.

- VIJAYAPALANI, P; MAESHIMA, M; NAGASAKI-TAKEKUCHI, N; MILLER, W. A. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathogens*, 8, e1002639, 2012.
- WEI, T; ZHANG, C; HONG, J; XIONG, R; KASSCHAU, K. D; ZHOU, X. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens*, 6, e1000962, 2010.
- ZERBINI, A. P., MAIA, I. G., FAVARO, R. D., CASCARDO, J. C. M., BROMMONSCHENKEL, S. H., & ZERBINI, F. M. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 352–361. 2009
- YANG, C.; GUO, R.; JIE, F.; NETTLETON, D.; PENG, J.; CARR, T.; YEAKLEY, J.M.; FAN, J.B.; WHITHAM, S.A. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Molecular Plant Microbe Interaction*, v. 20, p. 358-370, 2007.
- YOSHIKAWA, N.; OKADA, K.; ASAMUMA, K.; WATANABE, K.; IGARASI, A.; LI, C.; ISOGAI, M. A movement protein and three capsid proteins are all necessary for the cell-to-cell movement of apple latent spherical cheravirus. *Archives of Virology*, 2006.
- YASUDA M, ISHII Y, OHTA K. Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) as raw material for bioethanol production: pretreatment, saccharification, and fermentation. *Biotechnol Bioprocess Eng* 19:943–950. 2014
- WEI, T; ZHANG, C; HONG, J; XIONG, R; KASSCHAU, K. D; ZHOU, X. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens*, 6, e1000962, 2010.

**CAPÍTULO 2: Biological and molecular characterization of a highly divergent
Johnsongrass mosaic virus isolate from *Pennisetum purpureum***

Este capítulo foi publicado em versão ligeiramente modificada no periódico *Archives of Virology* por Silva KN, Melo FL, Orílio AF, Nagata T, Silva MS, Fernandes CD, Fragoso RR, Dessaune SN, Resende RO: **Biological and molecular characterization of a highly divergent johnsongrass mosaic virus isolate from *Pennisetum purpureum*.**

Archives of Virology, volume 161, issue 7, pp. 1981-1986, July 2016.

<https://doi.org/10.1007/s00705-016-2832-9>

Resumo: A sequência completa do genoma (9.865 nucleotídeos) de um isolado de *Johnsongrass mosaic virus* altamente divergente (JGMV-CNPGL) foi determinada usando o sequenciamento Illumina. Este isolado infectou 10 genótipos de plantas gramíneas, incluindo milho. Uma análise comparativa do genoma completo mostrou 80% de identidade de sequência nucleotídica, nt, (ou 86% de identidade de sequência de aminoácidos, aa) a um *Johnsongrass mosaic virus* da Austrália. Os valores de identidade da proteína de capa (CP), no entanto, foram inferiores aos de todo o genoma (78% e 80% para nt e aa, respectivamente) e estavam próximos dos valores de demarcação das espécies (77% nt e 80% aa). Inesperadamente, a porção amino terminal da CP de JGMV-CNPGL mostrou apenas 38% de identidade de sequência com outros isolados de JGMV. As implicações biológicas dessa divergência de sequência ainda precisam ser elucidadas.

Abstract: The complete genome sequence (9,865 nucleotides) of a highly divergent *Johnsongrass mosaic virus* isolate (JGMV-CNPGL) was determined using Illumina sequencing. This isolate infected 10 genotypes of gramineous plants including maize. A comparative analysis of the complete genome showed 80% nucleotide (nt) sequence identity (86 % amino acid (aa) sequence identity) to a *Johnsongrass mosaic virus* isolate from Australia. The coat protein (CP) identity values, however, were lower than those for the whole genome (78% and 80% for nt and aa, respectively) and were close to the species demarcation values (77% nt and 80% aa). Unexpectedly, the amino terminal portion of CP of JGMV-CNPGL showed only 38% sequence identity to other JGMV isolates. The biological implications of this sequence divergence remain to be elucidated.

Elephant grass (*Pennisetum purpureum*) is a perennial grass belonging to the *Poaceae* family, which includes maize, sorghum, wheat, rice, oat, barley, millet, brachiaria and panicum. Elephant grass, also known as napier grass, was first described in 1827 by Heinrich Schumacher in Africa, where this species was originated [2, 5]. A relatively recent study using nuclear and plastid genes, together with morphological analysis, suggested the unification of *Pennisetum*, *Odontelytrum* and *Cenchrus* under the former genus [5]. Elephant grass was introduced in Brazil in 1920 and was adapted to different soil types, except for poorly drained soils [4]. In the last 15 years, it has been used for cattle feeding due to its nutritional quality and yield [24]. Recently, its potential as biomass source for bioethanol production has been recognized [23]. Elephant grass has been propagated by vegetative means using mature stems [24], what could favor the accumulation of viruses. Up to date, four viral genera (*Potyvirus*, *Mastrevirus*,

Sobemovirus and an unclassified virus of *Luteoviridae* family) have been reported infecting this grass. In Brazil, *Johnsongrass mosaic virus* was recently reported infecting elephant grass by our research group [16].

Johnsongrass mosaic virus (JGMV; Family Potyviridae, genus Potyvirus) is an important viral species, which causes mosaic symptom and intense loss in several monocots plant this virus is transmitted in a non-persistent manner by the aphid species: *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum maidis* [20]. The virus was firstly described as *Maize dwarf mosaic virus* [18] and after as a Johnsongrass strain of *Sugarcane mosaic virus*, based on biological and serological properties in Australia [20; 21]. Moreover, Shukla and Ward [19] demonstrated, based on nucleotide and amino acid sequences of coat protein, that this virus was indeed a new species of *Potyvirus* genus, after renamed as *Johnsongrass mosaic virus*. Previous reports have demonstrated the occurrence of this virus in Australia [7; 8,18], South America [11, 12, 16] and the USA [13; 19]. In the USA, JGMV was firstly isolated in Texas and described as MDMV isolate capable of infect oat, johnsongrass and maize [13], and now this strain is designated JGMV-MDO [19]. JGMV has been also reported in Venezuela infecting several varieties of maize [6; 11] and in Colombia infecting *Brachiaria* spp. (JGMV-Brac) [12]. In a previous work a distinct JGMV isolate was reported in Brazil [16].

Here, we performed the biological and the complete molecular characterization of this unique JGMV Brazilian isolate (hereafter designated as JGMV-CNPGL). Firstly, potyvirus-like flexuous and filamentous viral particles were observed in leaves *P. purpureum*. Leaf tissues were contrasted with 2% phosphotungstic acid and then visualized in transmission electron microscopy (Fig. 2.1A). The JGMV-CNPGL obtained from *P. purpureum* (Fig. 2.1C) leaves was mechanically inoculated into 14 putative host plants to determine its host range and the characterization of symptoms expression. These

plants were kept in greenhouse for 30 days and the symptoms monitored during this period. The first symptoms appeared at 13 days after inoculation (dpi) and the infection was confirmed by RT-PCR using specific designed oligonucleotides (JG8352-F CAAAGCCCCATACTTGTCGG; JG9413-R TTAGCCCCACGGTATGAATG). Only 10 hosts were susceptible to the JGMV-CNPGL isolate presenting mainly two types of symptoms: chlorotic veins observed in *Zea mays* 2B587, *Zea mays* 3646H1 (Fig. 2.1B) and Millet ADR500 and mosaic symptoms in *Brachiaria brizantha* cv. Arapoty, *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, *Panicum maximum* cv. Mombaça (Guineagrass) (Fig. 2.1D), *Panicum maximum* cv. Massai, *Panicum maximum* C12, BRS Capileto, *Sorghum bicolor* BRS332 (Fig. 2.1E). The JGMV-CNPGL isolate was unable to infect Wheat BRS264, *Hordeum vulgare* L. VCU-CPAC (Barley), *Crotalaria juncea* and *Glycine max* (Soybean) under the tested conditions. Comparatively, JGMV-CNPGL host range was similar to those reported for JGMV-N [15] and JGMV-MDO [19]. Crucially, JGMV-CNPGL isolate was able to infect maize genotypes, suggesting that this virus represent a potential threat to this important crop. Brazil is the world's third largest maize producer planting, yearly, over 15.8 million ha, which represents 80 million ton of maize grains productions.

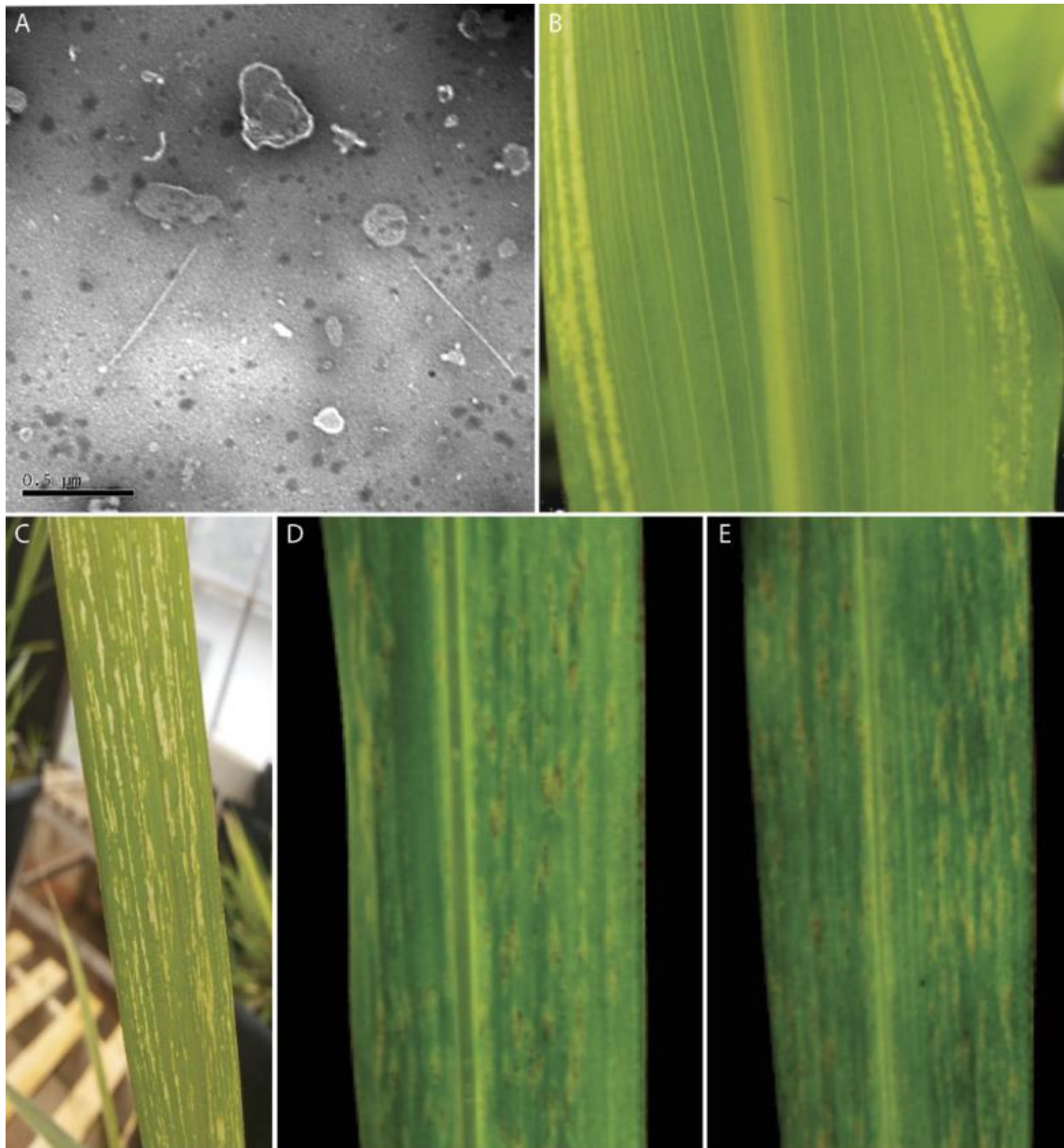


Fig. 2.1: A. Virus particles of *Johnsongrass mosaic virus* JGMV-CNPGL isolate infecting *Pennisetum purpureum*; B. Symptoms of isolate JGMV-CNPGL in *Zea mays* 3646H1; C. Symptoms induced by the JGMV-CNPGL isolate in *Pennisetum purpureum*; D. Symptoms of isolate JGMV-CNPGL in *Panicum maximum* cv. Mombaça; E. Symptoms of isolate JGMV-CNPGL in *Sorghum bicolor* BRS332.

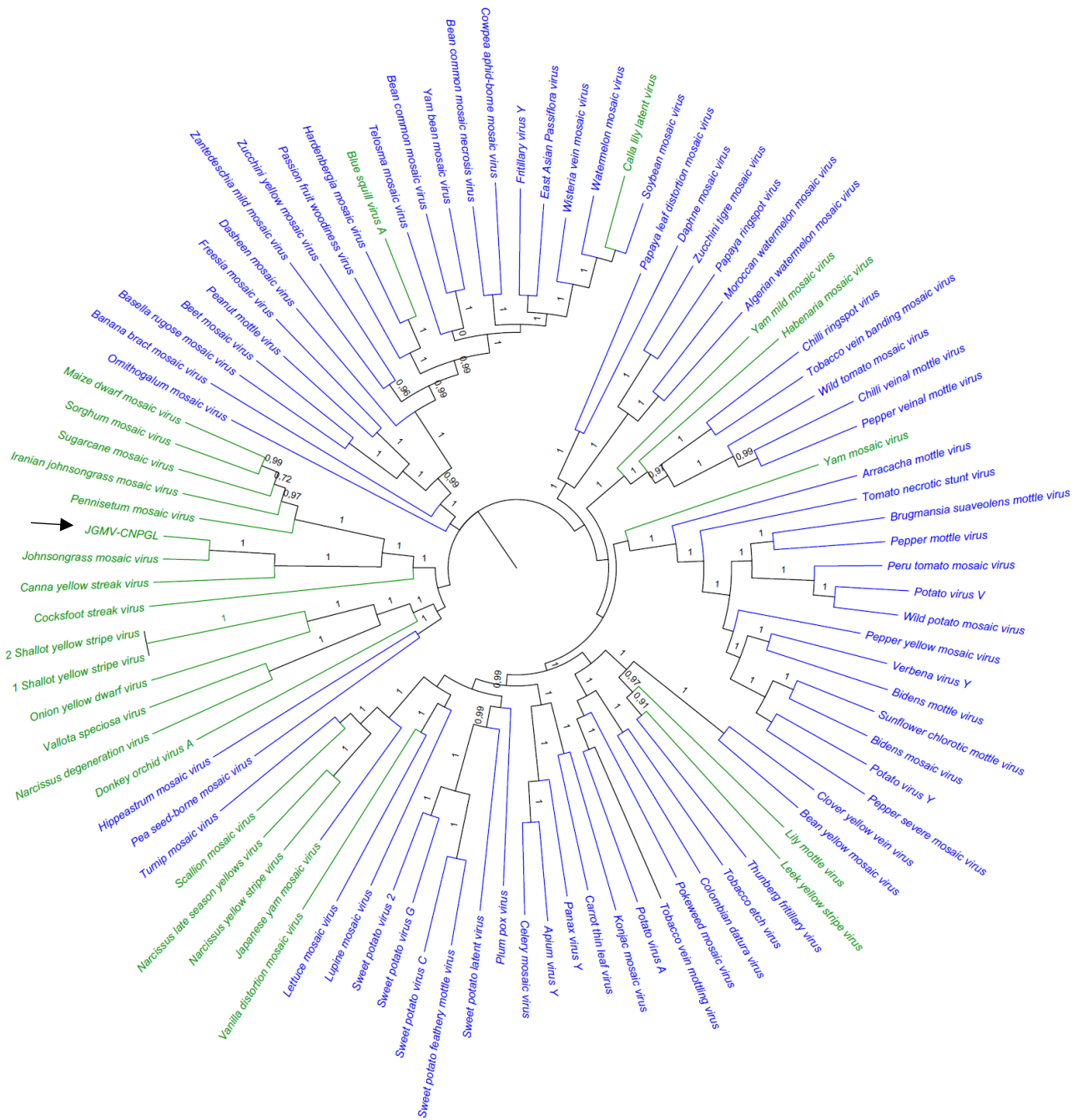


Fig. 2.2. Phylogenetic analysis using *Potyvirus* nucleotide sequences of the polyprotein. The blue color indicates virus species which infect dicotyledonous and the green color indicates of virus infecting monocots.

Table 2.1: Accession numbers of polyprotein sequences of distinct Potyviruses. Sequences were used for nucleotide and amino acid identities comparison and phylogenetic analysis of the Brazilian JGMV-CNPGL (Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite strain) with others *Potyvirus* genome sequences deposited in the GenBank.

Virus Species	N° Accession GenBank	Virus Species	N° Accession GenBank
<i>Japanese yam mosaic virus</i>	NC_000947	<i>Moroccan watermelon mosaic virus</i>	NC_009995
<i>Plum pox virus</i>	NC_001445	<i>Squash vein yellowing virus</i>	NC_010521
<i>Pepper mottle virus</i>	NC_001517	<i>Verbena virus Y</i>	NC_010735
<i>Tobacco etch virus</i>	NC_001555	<i>Algerian watermelon mosaic virus</i>	NC_010736
<i>Potato virus Y</i>	NC_001616	<i>Fritillary virus Y</i>	NC_010954
<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>	NC_001671	<i>Narcissus yellow stripe virus</i>	NC_011541
<i>Tobacco vein mottling virus</i>	NC_001768	<i>Zantedeschia mild mosaic virus</i>	NC_011560
<i>Papaya ringspot virus</i>	NC_001785	<i>Pepper veinal mottle virus</i>	NC_011918
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	NC_001841	<i>Cassava brown streak virus</i>	NC_012698
<i>Turnip mosaic virus</i>	NC_002509	<i>Triticum mosaic virus</i>	NC_012799
<i>Peanut mottle virus</i>	NC_002600	<i>Canna Yellow Streak virus</i>	NC_013261
<i>Soybean mosaic virus</i>	NC_002634	<i>Sugarcane streak mosaic virus</i>	NC_014037
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	NC_003224	<i>Sunflower chlorotic mottle virus</i>	NC_014038
<i>Maize dwarf mosaic virus</i>	NC_003377	<i>Freesia mosaic virus</i>	NC_014064
<i>Bean common mosaic virus</i>	NC_003397	<i>Panax virus Y</i>	NC_014252
<i>Sugarcane mosaic virus</i>	NC_003398	<i>Bidens mottle virus</i>	NC_014325
<i>Scallion mosaic virus</i>	NC_003399	<i>Pepper yellow mosaic virus</i>	NC_014327
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	NC_003492	<i>Brugmansia suaveolens mottle virus</i>	NC_014536
<i>Clover yellow vein virus</i>	NC_003536	<i>Sweet potato virus C</i>	NC_014742
<i>Dasheen mosaic virus</i>	NC_003537	<i>Passion fruit woodiness virus</i>	NC_014790
<i>Lettuce mosaic virus</i>	NC_003605	<i>Ugandan cassava brown streak virus</i>	NC_014791
<i>Johnsongrass mosaic virus</i>	NC_003606	<i>Lupine mosaic virus</i>	NC_014898
<i>Cocksfoot streak virus</i>	NC_003742	<i>Apium virus Y</i>	NC_014905
<i>Potato virus V</i>	NC_004010	<i>Celery mosaic virus</i>	NC_015393
<i>Leek yellow stripe virus</i>	NC_004011	<i>Hardenbergia mosaic virus</i>	NC_015394
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	NC_004013	<i>Chilli ringspot virus</i>	NC_016044
<i>Sorghum mosaic virus</i>	NC_004035	<i>Keunjongong mosaic virus</i>	NC_016159
<i>Potato virus A</i>	NC_004039	<i>Yam bean mosaic virus</i>	NC_016441

<i>Bean common mosaic necrosis virus</i>	NC_004047	<i>Tomato necrotic stunt virus</i>	NC_017824
<i>Wild potato mosaic virus</i>	NC_004426	<i>Hippeastrum mosaic virus</i>	NC_017967
<i>Peru tomato mosaic virus</i>	NC_004573	<i>Sweet potato virus 2</i>	NC_017970
<i>Yam mosaic virus</i>	NC_004752	<i>Vallota speciosa virus</i>	NC_017977
<i>Papaya leaf-distortion mosaic virus</i>	NC_005028	<i>Sweet potato virus G</i>	NC_018093
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	NC_005029	<i>Arracacha mottle virus</i>	NC_018176
<i>Oat necrotic mottle virus</i>	NC_005136	<i>Chinese yam necrotic mosaic virus</i>	NC_018455
<i>Lily mottle virus</i>	NC_005288	<i>Caladenia virus A</i>	NC_018572
<i>Beet mosaic virus</i>	NC_005304	<i>Iranian johnsongrass mosaic virus</i>	NC_018833
<i>Chilli veinal mottle virus</i>	NC_005778	<i>Pokeweed mosaic virus</i>	NC_018872
<i>Agropyron mosaic virus</i>	NC_005903	<i>Rose yellow mosaic virus</i>	NC_019031
<i>Hordeum mosaic virus</i>	NC_005904	<i>Ornithogalum mosaic virus</i>	NC_019409
<i>Watermelon mosaic virus</i>	NC_006262	<i>Yam mild mosaic virus</i>	NC_019412
<i>Cucumber vein yellowing virus</i>	NC_006941	<i>Blue squill virus A</i>	NC_019415
<i>Pennisetum mosaic virus</i>	NC_007147	<i>Colombian datura virus</i>	NC_020072
<i>Thunberg fritillary virus</i>	NC_007180	<i>Brugmansia mosaic virus</i>	NC_020105
<i>Wisteria vein mosaic virus</i>	NC_007216	<i>Sweet potato latent virus</i>	NC_020896
<i>Shallot yellow stripe virus</i>	NC_007433	<i>Sunflower mild mosaic virus</i>	NC_021065
<i>East Asian Passiflora virus</i>	NC_007728	<i>Calla lily latent virus</i>	NC_021196
<i>Konjac mosaic virus</i>	NC_007913	<i>Donkey orchid virus</i>	NC_021197
<i>Daphne mosaic virus</i>	NC_008028	<i>Habenaria mosaic virus</i>	NC_021786
<i>Pepper severe mosaic virus</i>	NC_008393	<i>Tall oatgrass mosaic virus</i>	NC_022745
<i>Blackberry virus Y</i>	NC_008558	<i>Bidens mosaic virus</i>	NC_023014
<i>Narcissus degeneration virus</i>	NC_008824	<i>Zucchini tigre mosaic virus</i>	NC_023175
<i>Basella rugose mosaic virus</i>	NC_009741	<i>Narcissus late season yellows</i>	NC_023628
<i>Telosma mosaic virus</i>	NC_009742	<i>Yellow oat-grass mosaic virus</i>	NC_024471
<i>Wild tomato mosaic virus</i>	NC_009744	<i>Carrot thin leaf virus</i>	NC_025254
<i>Banana bract mosaic virus</i>	NC_009745	<i>Vanilla distortion mosaic virus</i>	NC_025250
<i>Wheat eglid mosaic virus</i>	NC_009805	<i>Asparagus virus 1</i>	NC_025821
<i>Tobacco vein banding mosaic virus</i>	NC_009994		

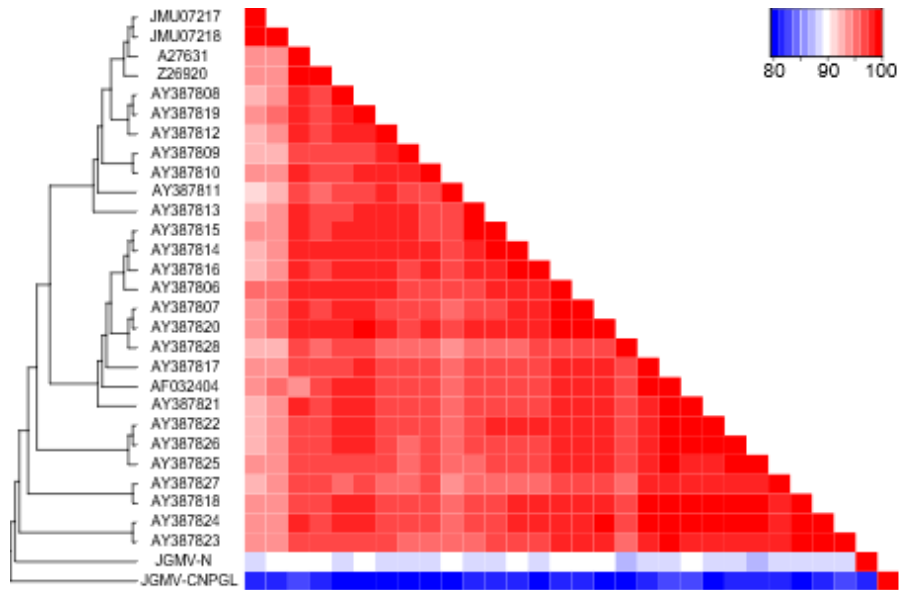


Fig. 2.3. Comparison matrix sequence and phylogenetic analysis of amino acids CP gene sequence JGMV-CNPGL with others JGMV sequences deposited in the GenBank from three different countries (Australia, United States and Nigeria). JGMV-USA (JMU07217 and JMU07218J); JGMV- Australia (A27631, Z26920, AY387808J, AY387819, AY387812, AY387809, AY387810, AY387811, AY387813, AY387815, AY387814, AY387816, AY387806, AY387807, AY387820, AY387828, AY387817, AF032404, AY387821, AY387822, AY387826, AY387825, AY387818, AY387824, AY387823 and JGMV - Nigeria (P83574J).

To perform the molecular characterization, leaves from the same plant used as inoculum for the host range trials were ground in liquid nitrogen, homogenized with PBS-EDTA and β -mercaptoethanol, after filtered with cheesecloth. The filtrate was further submitted to centrifugation through a sucrose cushion at 33,000 x g for 2 h and the pellet resuspended in PBS. After partial viral purification, total RNA was extracted using RNeasy plant mini kit (following the manufacturer's manual). The RNA samples were sequenced at Catholic University of Brasilia (UCB) using Nextera DNA Library

Preparation Kit and Illumina MiSeq platform. The paired-ends reads (7,402,180) were quality-filtered, adapter sequences were removed and assembled *de novo* using CLC Genomics Workbench version 6.0.3. The assembled contigs were submitted to blastx against the Viral RefSeq database and the contigs related to JGMV were selected and mapped to the reference genome of the JGMV (NC-003606). The final contig presented 9,865 nucleotides (nt), 2 open reading frames (ORFs) and 28,967 reads aligned back to it. ORF1 encodes a large polyprotein consisting of 3,059 amino acids (aa) encoded by 9,865 nt, which after proteolytic cleavage gives rise to P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-pro, NIb and CP functional proteins. A small ORF2 encodes P3N+PIPO protein that is embedded in the P3 cistron identified with the conserved motif G₁A₆ in the position 2,793-3,068 (91 aa). Moreover, several potyvirus motifs like HXDGXSG and FIIRGR in P1 [22], GDD in NIb, Y/FK/RNK in HC-Pro [17] and DAG in the CP are conserved. However, the KITC motif of HC-Pro, which is present in the JGMV Australian isolate, and proved to be involved in the interaction of viral particle and stylus [3] is absent in the JGMV-CNPGL isolate. The lacking of this conserved motif for most Potyviruses was also observed in other virus species of the same genus such as *Sweet potato feathery mottle virus* [14] and *Wisteria vein mosaic virus* [10]. Furthermore, the 5' untranslated region (UTR) was of 237 nt and the 3' UTR 451 nt, both confirmed using terminal-RACE strategy. The JGMV-CNPGL genome obtained was deposited in GenBank under the Accession No. KT833782.

The complete nucleotide sequence of JGMV-CNPGL ORF1 was aligned with other *Potyvirus* sequences (Table 2.1) using the translation alignment tool implemented in Geneious 7.1 [9]. As shown in Fig. 2.2, the JGMV-CNPGL clustered with the JGMV isolate and both sequences clustered with *Cana yellow streak virus*. These species are grouped in a clade whose members infect only monocots, suggesting an ancestral

adaptation to these hosts. A comparative analysis of the JGMV-CNPGL whole genome nucleotide sequences with other viruses available in GenBank showed a nucleotide identity of 81% nt (87% aa) with *Johnsongrass mosaic virus* (NC-003606) isolated in Australia. Nucleotide sequence identity between these viruses were 71% in P1, 76% in HC-Pro, 85% in P3, 86% in 6K1, 84% in CI, 83% in 6K2, 81% in VPg, 84% in Nia-pro, 85% in Nib, 78% in CP, 63% in 5'UTR and 85% in 3'UTR. As shown in Fig. 2.3, the CP comparison of the JGMV-CNPGL and the JGMV Australian isolates showed 78% and 82% of nucleotide and amino acid levels, respectively. These values are slightly above the threshold of species demarcation (76-77% nt and 80% aa sequence identity) [1]. Although these two isolates belong to the same species, the N-terminal region CP of JGMV-CNPGL is highly divergent in the amino acid positions from 9 to 85 aa residues, showing only 38% identity. Overall, they shared only 60% identity in the entire CP gene. The biological implications of this striking amino acid sequencing differences remain to be investigated. Considering that *P. purpureum* has originated in Africa, it is reasonable to assume that JGMV also originated in the same area and it will be important to increase sampling efforts to unravel the virus origin and its evolution in different ecological regions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to acknowledge the contribution of Dr. Francisco José da Silva Ledo for providing of *Pennisetum Purpureum* plant with symptoms of virus, Dr. Francisco Duarte Fernandes and Ivanilson Luis Lopes da Silva for providing of seeds. This work was financially supported by the National Council for Science and Technology (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Foundation for Research Support of the Distrito Federal (FAP-DF) and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa).

References

1. Araújo SAC, Deminicis BB, Campos PRS (2008) Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras Tropicais no Brasil. *Arch Zootec* 57:61–76
2. Bennet HW (1976) Pasto Johnson, pasto alfombra y otras gramíneas para el sur humedo de los Estados Unidos. In: Hugues HD, Heath ME, Metcalfe DS (eds) Forrajes, México, C.E.C.S.A., pp 321–334.
3. Wayne WH, Warren GM (1980) Yield, quality, and breeding behavior of Pearl Millet X Napiergrass interspecific hybrids. *Agron J* 72:358–36
4. Yasuda M, Ishii Y, Ohta K (2014) Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) as raw material for bioethanol production: pretreatment, saccharification, and fermentation. *Biotechnol Bioprocess Eng* 19:943–950
5. Silva KN, Nicolini C, Silva MS, Fernandes CD, Nagata T, Resende RO (2013) First report of Johnsongrass mosaic virus (JGMV) infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil. *Plant Dis* 97:1003
6. McDaniel LL, Gordon DT (1989) Characterization of the oat-infecting strain of maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology* 79:113–120
7. Teakle DS, Grylls NE (1973) Four strains of sugarcane mosaic virus infecting cereals and other grasses in Australia. *Aust J Agric Res* 24:465–477
8. Shukla DD, Gough KH, Ward CW (1987) Coat protein of potyviruses: comparison of amino acid sequences of the coat proteins of four Australian strains of sugarcane mosaic virus. *Arch Virol* 96:59–74
9. Taylor RH, Pares RD (1968) The relationship between sugarcane mosaic virus and mosaic virus maize and Johnson grass in Australia. *Aust J Agric Res* 19:767
10. Gough KH, Shukla DD (1993) Nucleotide sequence of Johnsongrass mosaic Potyvirus genomic RNA. *Intervirology* 36:181–192
11. Karan M, Noone DF, Teakle DS, Hacker JB (1992) Susceptibility of pearl millet accessions and cultivars to Johnsongrass mosaic and sugarcane mosaic viruses in Queensland. *Aust Plant Pathol* 21:128–130
12. Mariño AA, Garrido MJ, Ascanio A (2009) Reacción de cultivares de maíz al Potyvirus del mosaic del pasto Johnson. *Fitopatología Venezuela*. 22:35–36

13. Morales FJ, Ospina MD, Castaño M, Calvert LA (1996) Sequence analysis of the genomic RNA3-terminal region of a potyvirus from *Brachiaria* spp. related to Guineagrass mosaic virus. *J Phytopathol* 144:485–489
14. Seifers DL, Haber S, Ens W, She YMK, Standing G, Salomon R (2005) Characterization of a distinct Johnsongrass mosaic virus strain isolated from sorghum in Nigeria. *Arch Virol*. 150:557–576
15. Shukla DD, Ward CW (1989) Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Arch Virol* 106:171–200
16. Garrido MJ, Trujillo GE (1993) Occurrence of Johnsongrass mosaic virus on sorghum in Venezuela. *Plant Dis* 77:847
17. Verchot J, Herndon KL, Carrington JC (1992) Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* 190:298–306
18. Shibolet Y, Haronsky E, Leibman D, Arazi Tzahi, Wassenecker M, Whitham SA, Gaba V, Amit Gal-On A (2007). The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J Virol* 81:13135–13148
19. Blanc S, Ammar ED, Garcia-Lampasona S, Dolja VV, Llave C, Baker J, Pirone TP (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interaction with virions and aphid stylets. *J Gen Virol* 79:3119–3122
20. Jayaram Ch, Hill JH, Miller AW (1992) Complete nucleotide sequences of two soybean mosaic virus strains differentiated by response of soybean containing the Rsv resistance gene. *J Gen Virol* 73:2067–2077
21. Liang WX, Song LM, Tian GZ, Li HF, Fan ZF (2006) The genomic sequence of Wisteria vein mosaic virus and its similarities with other potyviruses. *Arch Virol* 151(11):2311–2319
22. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinf Appl Note* 28:647–1649
23. Adams MJ, Antoniw JF, Fauquet CM (2005) Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch Virol* 150:459–479

CAPÍTULO 3: Sequência completa do genoma de *Maize chlorotic dwarf virus* encontrado infectando *Brachiaria* no Brasil

3.1. Introdução

Maize chlorotic dwarf virus (MCDV) foi descrito pela primeira vez no sudeste dos Estados Unidos, onde o vírus é economicamente prejudicial à cultura do milho. Esse vírus causa sintomas de descoloração severa nas folhas, redução no crescimento das plantas, murcha da planta, vermelhidão ou amarelecimento de folhas e clorose das nervuras terciárias (Lopes et al., 1994; Reddick et al., 1997). Alguns isolados já foram descritos com diferenças em sua sintomatologia em outras regiões do mundo. O isolado MCDV-S, MCDV-T ou MCDV-TN e o isolado de MCDV-OH causam sintomas severos em milho, como mosaico e amarelecimento das folhas, murcha da planta e ocasionalmente dificuldade no crescimento de plantas. O isolado MCDV-M1 causa sintomas leves, entretanto, uma coinfeção com o isolado MCDV-T pode causar uma redução de crescimento de plantas de milho infectadas (Roth et al., 1994). Esse capítulo corresponde ao primeiro relato de MCDV no Brasil e ainda demonstra pela primeira vez que MCDV, pelo menos esse isolado, tem *Brachiaria brizantha* como hospedeira, causando sintomas de mosaico interneval em suas folhas.

A caracterização de um genoma viral ocorre principalmente pelo conhecimento da sua sequência nucleotídica completa. Com base nessa sequência completa, vários estudos podem ser desenvolvidos, levando ao entendimento da organização genômica viral, bem como ao conhecimento de seu processo infectivo, associado a replicação, movimento na célula e a estratégia viral para superar o sistema de defesa das plantas.

Tradicionalmente, devido aos genomas virais serem pequenos, a técnica de “*genome walking*” vem sendo utilizada para a obtenção de sequências completas de vírus a partir de desenhos sucessivos de oligonucleotídeos (Marston et al., 2007). Apesar de importante, esta metodologia demanda tempo e esforço, podendo ser dificultada devido

à variação dentro de cada espécie de vírus, o que resulta na necessidade de reformulação dos pares de oligonucleotídeos e frequente re-otimização das condições de PCR (Marston et al., 2013). A introdução de erros, seja durante a amplificação por PCR, duplicação de DNA plasmidial em *E. coli* ou reação de sequenciamento baseado em Sanger, é problemática por gerar artefatos. O uso de enzimas com alta fidelidade e o sequenciamento direto de produtos de PCR podem minimizar mutações geradas pelas técnicas, assegurando que diferenças nas sequências são decorrentes da diversidade natural dos vírus (Bracho et al., 1998). A introdução de erros pode ser evitado utilizando plataformas de sequenciamento em larga escala, que geram milhões de sequências, permitindo assim à obtenção de sequências completas de vírus. As vantagens das tecnologias de sequenciamento em larga escala em virologia são numerosas e seu uso está se tornando mais comum (Radford et al., 2012), particularmente para detectar e caracterizar patógenos sem o conhecimento prévio de sua existência e sem o requisito de oligonucleotídeos específicos (Wu et al., 2012). O uso recente desta tecnologia em virologia vegetal revelou que algumas doenças de etiologia desconhecida, que afetam diversas plantas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas, são causadas por vírus não descritos ou pouco conhecidos. Essas plataformas de sequenciamento têm se mostrado uma boa opção para a investigação de doenças de etiologia desconhecida (Howell et al., 2011).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi à obtenção do genoma completo e a caracterização molecular de *Maize chlorotic dwarf virus*, denominados aqui de isolado MCDV-BR.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Obtenção dos isolados de *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV)

Folhas de *Panicum* spp. e *Brachiaria* spp. com sintomas de vírus foram coletadas na Embrapa Gado de Corte, no Estado do Mato Grosso do Sul, em março de 2013. As plantas sintomáticas coletadas fazem parte do programa de melhoramento genético de plantas forrageiras da Embrapa Gado de Corte (Figura 3.1).

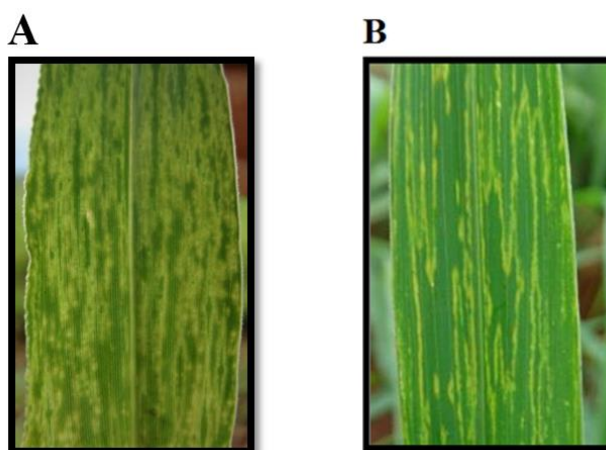


Figura 3.1: Sintomas de infecção por vírus observados em bancos ativos de germoplasma da Embrapa Gado de Corte. (A) Híbrido de *Brachiaria* B-S73=3022 com sintomas de mosaico internerval; (B) Híbrido PM-19/2004 com sintomas de mosaico.

3.2.2. Enriquecimento da fração viral

O processo de enriquecimento da fração viral foi realizado com o objetivo de aumentar a concentração nos extratos de partículas virais com formato icosaédrico e/ou flexuoso. Folhas de *Panicum maximum* (5 acessos) e *Brachiaria* (5 acessos), descritos na Tabela 3.1, foram maceradas com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para tampão fosfato 0,1 M com EDTA 1 mM e 200 μ l de β -mercaptoetanol foram adicionados. Em seguida, a amostra foi filtrada com gaze e centrifugada por 20 min a 5000 rpm (3.836 x g) em uma centrífuga preparativa. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para 2 tubos de ultracentrífuga e adicionou-se uma solução de sacarose 20% (20 ml) para a formação do colchão de sacarose que foi centrifugado a 33.000 x g por 2 h. Após o

enriquecimento da fração viral o RNA viral foi extraído com o kit RNeasy plant mini kit (Qiagen), seguindo o manual do fabricante. Após a extração de RNA, as amostras de *Panicum* e *Brachiaria* foram combinadas formando uma amostra composta e enviadas para a o sequenciamento de nucleotídeos.

Tabela 3.1: Plantas utilizadas no processo de enriquecimento viral para o sequenciamento do genoma completo do MCDV e detecção do vírus por RT-PCR

Nome original	Código
<i>Panicum maximum</i> Hugo Gen- 09/2013	PM-09/2013
<i>Panicum maximum</i> Hugo Gen-19/2004	PM-19/2004
<i>Panicum maximum</i> planta filha Hugo 207 PMI-14/207	PM-207
<i>Panicum maximum</i> PMI18/2009	PMI-18/2009
<i>Panicum maximum</i> híbrido H8	PM-H8
<i>Brachiaria humidicula</i> -H6	BH-H6
Híbrido de <i>Brachiaria</i> (Progênie de meio irmão de <i>B. ruziziensis</i>)	HB
<i>Brachiria decumbens</i> x <i>Brachiaria brizantha</i> x <i>Brachiaria ruziziensis</i> -híbrido sexual-S73=3022	B-S73=3022
<i>Brachiaria brizantha</i> B138	BB138
<i>Brachiaria</i> spp. híbrido meio-irmão-exp9 parc 836	B-836

3.2.3. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática

As amostras de RNA originárias da fração viral foram agrupadas formando uma amostra composta, que foi sequenciada na Macrogen INC. (Coréia do sul), utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000.

As sequências obtidas (*reads*) foram montadas usando CLC Genomics Workbench 7.0. Os *contigs* montados foram submetidos à análise do programa BLASTx contra o banco de dados viral RefSeq (GenBank) e os *contigs* relacionados com sequências virais de plantas foram selecionados. A análise do genoma foi realizada utilizando o programa Geneious 7.1.

A partir das sequências geradas, após a identificação de *Maize chlorotic dwarf virus* nas amostras sequenciadas, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos para a detecção desse vírus nas plantas sintomáticas selecionadas para o estudo.

3.2.4. Detecção de MCDV por RT-PCR nas plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho

A detecção teve o objetivo de confirmar a presença do vírus nas plantas utilizadas para a identificação e o sequenciamento viral. A partir do consenso de *contigs* do genoma viral obtido, o gene da CP foi analisado para desenho de oligonucleotídeos específicos destinados ao diagnóstico do vírus MCDV por RT-PCR em *Panicum spp.* e *Brachiaria spp.* O RNA total foi extraído de folhas de *Panicum spp.* e *Brachiaria spp.* (100 mg) utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific), seguindo instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa do kit SuperScript III (Thermo Fisher Scientific), a partir dos oligonucleotídeos reverso específico MCDV4392 ACCAAGGCCTCGAATGCAC. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 5 µl de RNA total, 1 µl de dNTP (10mM), 1 µl do primer MCDV4392 (10mM) e 5 µl de H₂O DEPC (Diethyl Pyrocarbonate), seguida de 5 min de incubação a temperatura de 65 °C para abrir a fita de RNA. Posteriormente, foi adicionado 4 µl de 5X First-Strand Buffer, 2 µl de DTT (100mM), 1 µl da enzima SuperScript III (200U) e 1 µl de RNase out. A temperatura de incubação utilizada nesta etapa foi de 55 °C, seguida por um período de incubação a 70 °C por 15 min para a inativação da enzima.

A Platinum Taq DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific) foi utilizada para a realização da PCR, seguindo instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos específicos utilizados na RT-PCR foram: MCDV2869 5'AGCCGCCACCCAATCAGTTT3' e MCDV4392 5'ACCAAGGCCTCGAATGCAC3'. Para a PCR utilizou-se 1 µl de cada

oligonucleotídeo (10 µM) MCDV2869 e MCDV4392, 5 µl de 10X PCR Buffer, 1,5 µl de 50 mM MgCl₂, seguida de 1 µl de dNTP, 1 µl de Taq DNA Polymerase Platinum, 3 µl do cDNA e 36 µl de H₂O, para uma reação de final de 50 µl. Os produtos das PCRs foram aplicados em gel de agarose e os fragmentos com tamanho esperado foram extraídos do gel e purificados seguindo instruções do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

3.2.5. Clonagem da CP de MCDV das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho

Os fragmentos amplificados, purificados e eluídos foram ligados no vetor para clonagem de produtos de PCR pGEM® -T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A ligação entre os insertos e o vetor foi feita com a utilização da T4 DNA Ligase (Promega) incubando por 16 h a 16 °C no termociclador e clonados em *E. coli* da linhagem DH10B. Após a clonagem os plasmídeos foram enviados para sequenciamento.

3.2.6. Isolamento da região 3' do genoma de MCDV - 3'RACE

O 3'RACE consiste na amplificação por RT-PCR da extremidade 3' de um mRNA a partir de um segmento interno de sequência pré-determinada. No 3'RACE, aproveita-se a cauda poli-A, existente na extremidade 3' de mRNAs, como sítio de anelamento para um *primer* genérico para que em conjunto com um *primer* específico interno, amplificar a sequência compreendida entre ambos.

Folhas do Híbrido de *Brachiaria S73=3022* com sintomas virais foram maceradas com nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) com o *primer* OligodT M10 5' AAGCAGTGTTATCAACGCAGAT₅₀3' de acordo com as instruções do fabricante. A PCR foi realizada utilizando-se a enzima DNA polimerase LongAmp

(NEB), com a utilização dos pares de oligonucleotídeos MCDV-10125F-TGTAAGGTGGTTGTCTATGGAG´3 e OligodTM10a 5´AAGCAGTGTATCAACGCAGA3´ (Figura 3.2). Os produtos das PCRs foram aplicados em gel de agarose e os fragmentos com tamanho esperado foram extraídos do gel e purificados seguindo instruções do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Os produtos de PCR eluídos foram ligados no vetor de entrada para produtos de PCR pGEM® -T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A ligação entre os insertos e o vetor foi feita com a utilização da T4 DNA Ligase (Promega) permanecendo overnight a 16 °C no termociclador e clonados em *E. coli* da linhagem DH10B. Após a clonagem os plasmídeos foram enviados para sequenciamento.

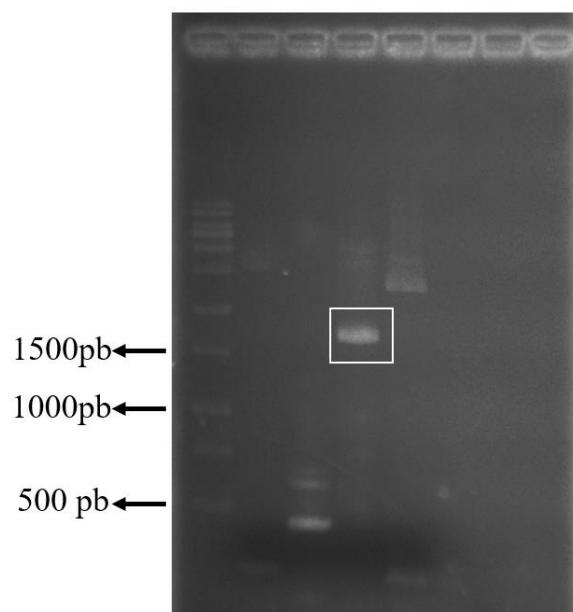


Figura 3.2: Eletroforese de 3´UTR de MCDV-BR. Análise do produto de PCR seguindo estratégia de 3´RACE por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando os fragmentos amplificados da região 3´UTR com amplicons de 1.725 pb. Marcador de massa molecular 1kb Ladder Ludwig.

3.2.7. Isolamento da região 5' do genoma de MCDV 5'RACE

Para a amplificação da extremidade 5' utilizou-se o kit 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Thermo Fisher Scientific), seguindo instruções do fabricante. O 5'RACE consiste em uma estratégia para amplificar por RT-PCR a extremidade 5' não conhecida de um mRNA a partir de fragmentos internos de sequência conhecida. A síntese de cDNA é feita utilizando *primer* "reverso". Uma sequência homopolimérica, neste caso de Citidina (Citosina) é adicionada a extremidade 3' com a enzima Terminal Desoxinucleotídeo Transferase (TdT). A primeira PCR é realizada com um segundo *primer* específico, mais interno ao primeiro e um *primer* complementar a região adicionada que possui uma região âncora que vai ser utilizada nas próximas rodadas de PCR (Primer AAP-G). Na segunda etapa, um terceiro *primer* específico, mais interno ao segundo é utilizado, e o *primer* AUAP que vai anelar a região âncora da primeira PCR.

Folhas do Híbrido de *Brachiaria S73=3022* com sintomas virais foram maceradas com nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific) com o *primer* MCDVGSP467 5'CCTCGGCTCGTGTCACCTAAT'3 de acordo com as instruções do fabricante. A PCR foi realizada utilizando-se a enzima DNA polimerase LongAmp (NEB) e os pares de oligonucleotídeos MCDVGSP320 5'TTAGCAACCACCTCTGCA TC3' e AAP-Poli G para a primeiras MCDVGSP230 5'CTTAACACACGCCTAGTACT 3' e AUAP para a segunda PCR (Figura 3.3). Os produtos das PCRs foram separados e visualizados em gel de agarose e os fragmentos com tamanho esperado foram extraídos do gel e purificados seguindo instruções do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Os produtos de PCR eluídos foram ligados no vetor de entrada para

produtos de PCR pGEM® -T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A ligação entre os insertos e o vetor foi feita com a utilização da T4 DNA Ligase (Promega) incubando por 16 h a 16 °C no termociclador e clonados em *E. coli* da linhagem DH10B. Após a clonagem os plasmídeos foram enviados para sequenciamento.

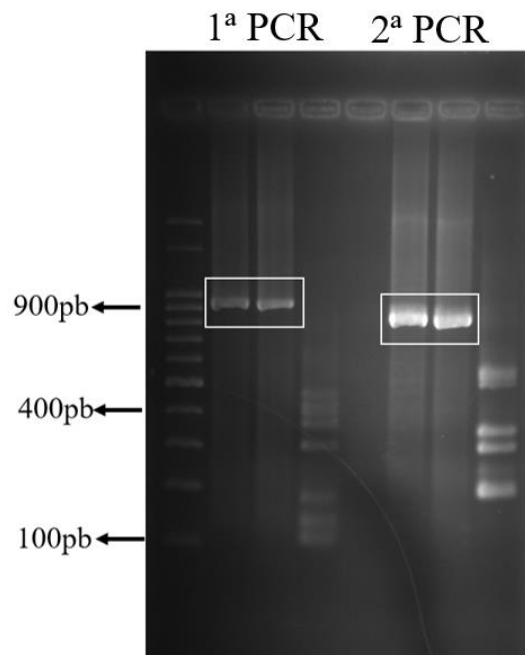


Figura 3.3: Eletroforese de 5'UTR de MCDV-BR. Análise do produto de PCR em gel de agarose 1% mostrando os fragmentos amplificados da região 5'UTR via a técnica de 5'RACE. (A) primeira rodada de PCR com amplicon de 986 pb (B) Segunda rodada de PCR com amplicon de 897pb. Marcador de massa molecular de 100 pb (Ludwig).

3.2.8. Árvore filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de máxima verossimilhança implementado no algoritmo Fastree (Price et al 2009) com bootstrap de 1000 repetições, disponível no programa Geneious 7.1 (Kearse et al., 2012).

3.3. Resultados e Discussão

A partir do sequenciamento de alto desempenho, foram obtidos aproximadamente 40.599.252 *reads* com tamanho de 100 pb. A montagem foi realizada gerando 5.530 *contigs*, dos quais 1 *contig* de tamanho 11.930 nt que correspondia ao genoma parcial de *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV). Neste mesmo sequenciamento foi encontrado também o vírus *Johnsongrass mosaic virus* descrito no capítulo anterior.

Para a confirmação da presença do MCDV nas diferentes espécies de plantas foi realizada uma RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para este vírus. Com isso, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 1.520 pb, correspondendo ao gene de CP3 e CP1. Destacamos que a RT-PCR somente identificou o vírus na planta *Brachiaria S73=3022*. A confirmação da detecção foi realizada por meio de clonagem e sequenciamento deste produto amplificado.

O consenso gerado a partir dos *contigs* montados demonstrou a presença de uma ORF (open reading frame) de vírus de 10.446 nt. As regiões não traduzidas (UTRs) 5'UTR e 3'UTR foram isoladas por RACE e confirmadas pelo sequenciamento Sanger, apresentando respectivamente 442 e 1087 nt. A análise do genoma viral, após o sequenciamento completo do isolado brasileiro de MCDV, confirmou presença de ORFs na orientação ceno positivo. A ORF1 codifica então uma poliproteína de 3.481 aa, com massa molecular predita de 392,99 kDa, começando no códon de iniciação AUG na posição 443 nt e terminando no códon de terminação UGA na posição 10.886 nt do genoma. As três pequenas ORFs descritas por Reddick e colaboradores (1997) para o isolado MCDV-TN e por Chaouch e colaboradores (2004) para o isolado MCDV-S não foram identificadas nos isolados MCDV-BR e MCDV-M1. Contudo, será necessário a realização de experimentos complementares para confirmar a presença dessas pequenas ORFs no genoma de *Maize chlorotic dwarf virus*. A ORFx, descrita por Firth e

colaboradores (2008), se encontra sobreposta na região N-terminal da poliproteína na fase de leitura +1, foi identificada entre 969 nt e 1238 nt, ou seja, com 270 nt e codificando proteína de 90 aa.

O MCDV-BR é composto por um ssRNA senso positivo, com tamanho de genoma de 11.975 nt de comprimento, entretanto, a presença da VPg ainda não foi confirmada. A organização genômica do isolado MCDV-BR está esquematizada na Figura 3.4.

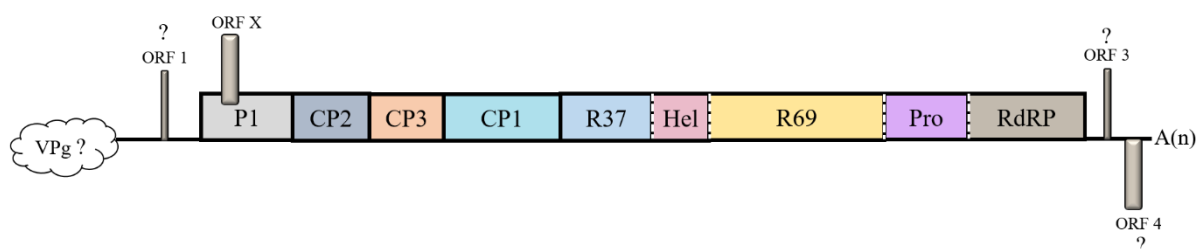


Figura 3.4: Organização genômica do vírus MCDV-BR. A representação foi montada de acordo com Chaouch e colaboradores (2004). Os sítios de clivagem da poliproteína validados experimentalmente são mostrados como linhas sólidas. Os sítios de clivagem não confirmados são mostrados como linhas tracejadas brancas. A interrogação indica as ORFs não encontrada no isolado MCDV-BR.

Na comparação da sequência de aminoácidos da poliproteína do isolado MCDV-BR com os isolados MCDV-S, MCDV-M1, MCDV-TN, RTSV (*Rice tungro spherical virus*), BVCV (*Bellflower vein chlorosis virus*) e PYFV (*Parsnip yellow fleck virus*, espécie do gênero *Sequivirus* mais próxima filogeneticamente), o isolado brasileiro mostrou ser mais próximo do isolado MCDV-M1, com 75% de identidade na sequência de aminoácidos, seguido dos isolado MCDV-TN com 72%, MCDV-S com 58%, BVCV com 35%, RSTV com 32% e PYFV com 17%. Apesar da sequência da poliproteína do MCDV-BR não ser tão conservada com as de isolados de MCDV descritos, foram identificados vários domínios altamente conservados entre os isolados.

O motivo conservado GxxGxGKS (Blinov et al., 1989), presente na proteína NTP-binding e característico dos vírus pertencentes a ordem *Picornavirales*, foi encontrado na

posição 1776-1783 (GPPGVGKS) no isolado MCDV-BR. O motivo conservado adicional DD na proteína NTP-binding foi também identificado na posição 1827-1828 (Turnbull-Ross et al., 1992). Na região similar em todos os picornavirais da cisteína protease 3C-Like, a tríade catalítica de histidina (H), aspartato (D) e cisteína (C) (Gorbalenya et al., 1989), que caracteriza esta proteína, está presente nas posições 2690, 2728 e 2822, respectivamente. Esta protease tem especificidade por clivagem na ligação aminoácidos entre o aminoácido glutamina (Q) e um aminoácidos com cadeias laterais curtas, como valina (V) e serina (S) (Chaouch et al., 2004; Allaire et al., 1994; Druka et al., 1996). Com isso, como relatado por Reddick e colaboradores (1997) e Chaouch e colaboradores (2004), os sítios de clivagem das proteínas CP2 de Q/S, CP3 de Q/M e CP1 de Q/V estão presentes igualmente para o isolado MCDV-BR. Finalmente, na RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), presente na região C-terminal da poliproteína foram encontrados 3 domínios conservados análogos aos “picorna-like”. No domínio A, o motivo DYSKFDGIGPP foi encontrado nas posições 3166-3176, no domínio B o motivo SGFAMTVIFNS foi identificado na posição 3227-3237 e no domínio C o motivo YGDD foi localizado entre os aminoácidos 3275-3279.

O critério de demarcação de espécie para a família *Secoviridae* é definido como 75% de identidade de aminoácidos de CP, bem como a quantidade de CPs presente no genoma, e 80% de identidade de aminoácidos de Pol (RNA polimerase dependente de RNA). Considerando esses parâmetros, a análise da sequência de aminoácidos da poliproteína revelou que o isolado MCDV-BR apresentou de 81 a 85% de identidade de aminoácidos da CP e de 80 a 84% de identidade de Pol quando comparado com essas proteínas de outros isolados de MCDV depositados no GenBank. Vale ressaltar que os isolados MCDV-S e MCDV-Type apresentaram 64 e 65% de identidade de aminoácidos de CP e 58 e 59% de identidade de aminoácidos de Pol, podendo ser uma nova espécie,

de acordo com o critério de demarcação de espécies. A análise filogenética de CP e de Pol revela a diferença deste isolado, pois este claramente localizou-se em um ramo distinto separado de todos isolados de MCDV (Figura 3.5 e 3.6).

Este é o primeiro relato do vírus MCDV infectando *Brachiaria* em condições não experimentais. Os hospedeiros naturais deste vírus são exclusivamente monocotiledôneos como milho e sorgo. Nault e colaboradores (1973) descreveram a infecção experimental de MCDV em *Panicum miliaceum*, *Pennisetum glaucum*, *Sorghum saccharum* (Sorgo Sacarino), *Sorghum sudanense* (Capim de Sudão), *Triticum* spp (trigo), *Zea mays* (milho) e *Sorghum halepense* usando o inseto vetor (*G. nigrifrons*). Entretanto, para o isolado MCDV-BR, não foi possível a realização do espectro de hospedeiros, pois o inseto vetor para este isolado brasileiro ainda é desconhecido. Portanto, o desenvolvimento de um clone infeccioso do vírus será uma alternativa para auxiliar na determinação do espectro de hospedeiro deste isolado. A importância da realização do espectro de hospedeiro é para o melhor entendimento da importância e dos possíveis danos deste vírus para a agropecuária do país, já que também representam uma ameaça potencial para outras plantas cultivadas, como por exemplo, milho, trigo, arroz, cana-de-açúcar, cevada e sorgo.

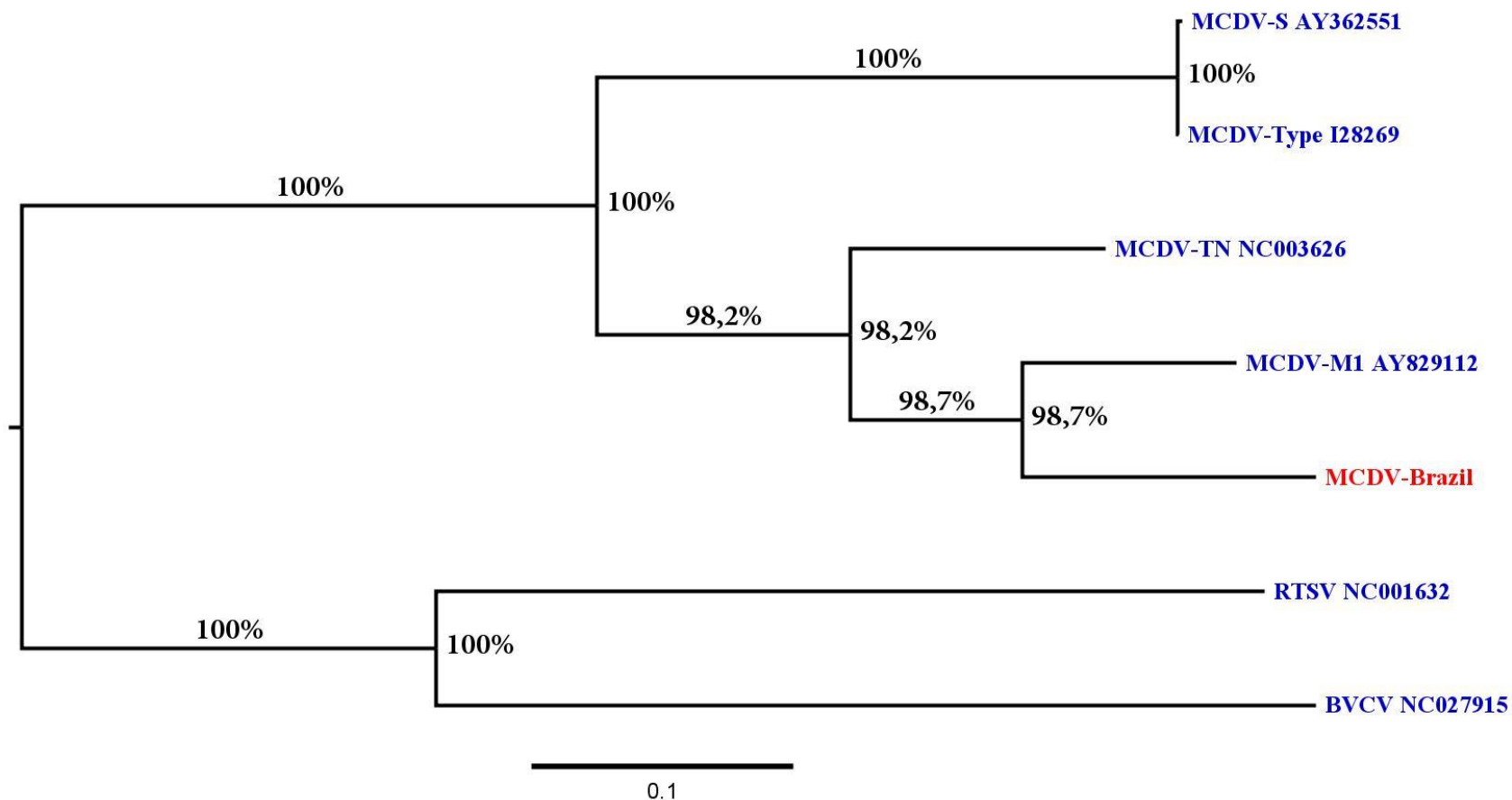


Figura 3.5: Árvore filogenética utilizado as sequências de aminoácidos da polimerase (Pol) das espécies virais da família *Secoviridae*. MCDV (*Maize chlorotic dwarf virus*): Isolado MCDV-M1 (Isolado fraco-AY829112), MCDV-TN (Isolado do estado de Tennessee- U67839) ou isolado MCDV-T (Isolado tipo), e o isolado MCDV-S (Isolado severo- AY36255), MCDV-BR (Isolado brasileiro em vermelho), RTSV (*Rice tungro spherical virus*), BVCV (*Bellflower vein chlorosis virus*). Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança implementado no algoritmo Fasttree (Price et al 2009) com bootstrap de 1000 repetições.

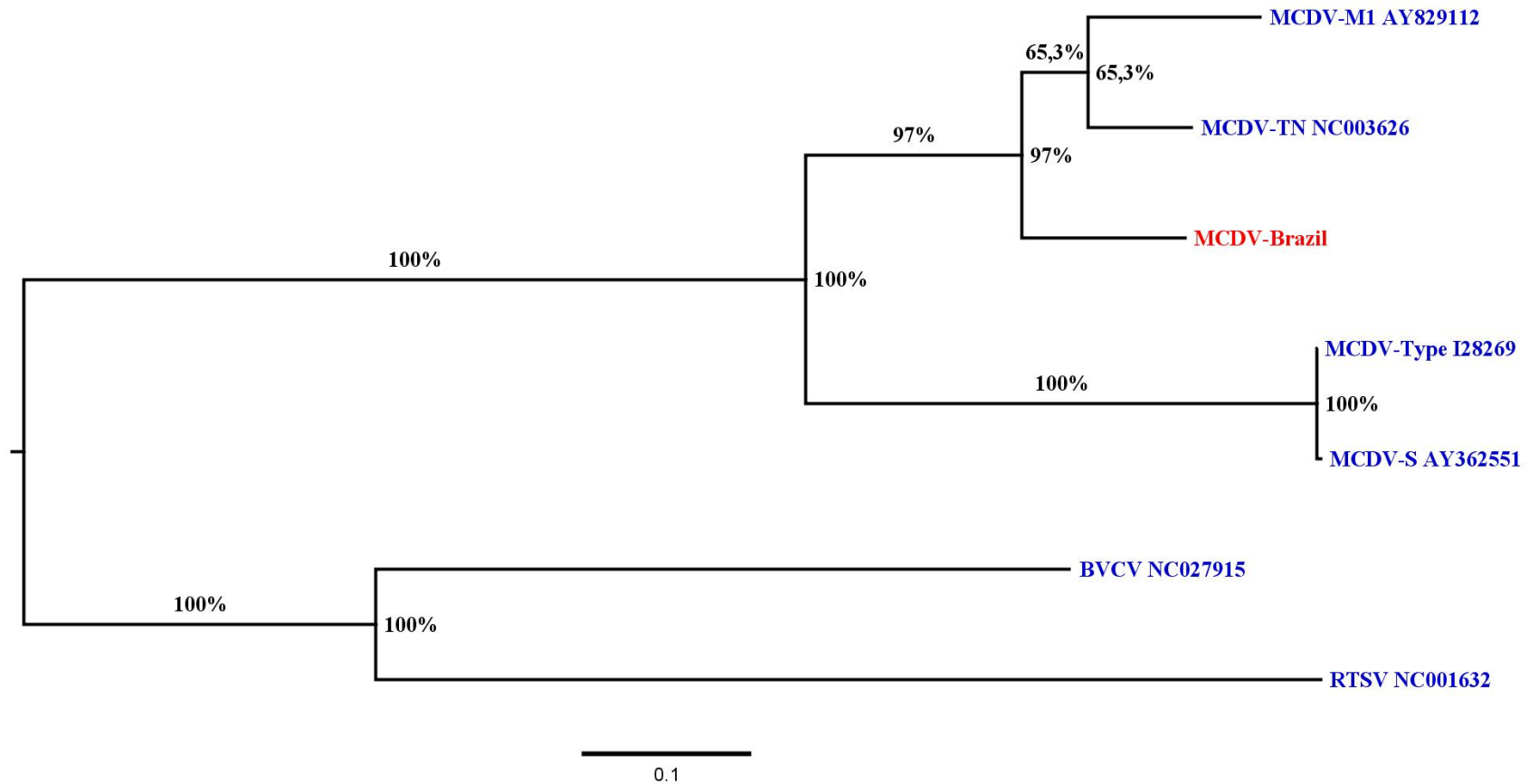


Figura 3.6: Árvore filogenética utilizado as sequências de aminoácidos da capa proteica (CP) das espécies virais da família *Secoviridae*. MCDV (*Maize chlorotic dwarf virus*): Isolado MCDV-M1 (Isolado fraco-AY829112), MCDV-TN (Isolado do estado de Tennessee- U67839) ou isolado MCDV-T (Isolado tipo), e o isolado MCDV-S (Isolado severo- AY36255), MCDV-BR (Isolado brasileiro em vermelho), RTSV (*Rice tungro spherical virus*), BVCV (*Bellflower vein chlorosis virus*). Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança implementado no algoritmo Fastree (Price et al 2009) com bootstrap de 1000 repetições.

3.4. Conclusão

Este trabalho descreve pela primeira vez a infecção natural de isolado de *Maize chlorotic dwarf virus* em *Brachiaria* e também descreve pela primeira vez de MCDV no Brasil. Com base na filogenia e na comparação de sequências de aminoácidos e nucleotídeos foi possível comprovar que o vírus isolado de *Brachiaria* S73=3022 pertence a espécie *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV).

Além de *Maize chlorotic dwarf virus*, foi encontrado um segundo vírus infectando essas plantas, o *Johnsongrass mosaic virus*, que pertence à família *Potyviridae* e gênero *Potyvirus*. (já relatado por Silva et al. 2016). Estudos de interação entre esses dois vírus, com possíveis insetos vetores e suas plantas hospedeiras serão realizados para o melhor entendimento desse tipo de interação e do processo epidemiológico desses vírus.

As informações geradas serão utilizadas no Programa de Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras na Embrapa Gado de Corte, visando o desenvolvimento de linhagens resistentes a MCDV e a outros vírus que infectam forrageiras.

3.5. Referências bibliográficas

- ALLAIRE, M.; CHERNALA, M.M.; MALCOLM, B.A.; JAMES, M.N.G. Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin-like serine proteinases. *Nature*, v. 369, p. 72-76, 1994.
- BLINOV, V.M.; KOONIN, E.V.; GORBALENYA, A.E.; KALIMAN, A.V.; KRYUKOV, V.M. Two early genes of bacteriophage T5 encode proteins containing an NTP-binding sequence motif are probably involved in DNA replication, recombination and repair. *FEBS Letters*, v. 252, 47-52, 1989.
- BRACHO, M.A.; MOYA, A.; BARRIO, E. Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *Journal of General Virology*, v. 79, n. 12, p. 2921-2928, 1998.
- CHAOUCH-HAMADA, R.; REDINBAUGH, M.G.; MARRAKCHI, M.; HOGENHOUT, S.A. Genomics of the severe isolate of *Maize chlorotic dwarf virus*. *Plant Prot. Sci.* 40:113-119. 2004.
- DRUKA, A.; ZHANG, S.; YAN, Y.; BURNS, T.M.; HULL, R. Investigation of the leader sequence and upstream genes of rice tungro spherical virus. In: *Proc. 3rd Int. Rice. Genet. Symp.*, Manila, 1995. 1996.
- FIRTH, A.E.; ATKINS, J.F. Bioinformatic analysis suggests that a conserved orf in the waikaviruses encodes an overlapping gene. *Archives of Virology*, v. 153, p. 1379-1383, 2008.

- GORBALENYA, A.E.; DONCHENKO, A.P.; BLINOV, V.M.; KOONIN, E.V. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin- like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Letters*, v. 243, p. 103-114, 1989.
- HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, W.; Eds; The American Phytopathological Society Press: St. Paul, MN, USA, p. 259-265, 2011.
- HOWELL, W.E.; THOMPSON, D.; SCOTT, S. Virus-like disorders of fruit trees with undetermined etiology. In *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics Applications Note*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- MARSTON, D.A.; MCELHINNE, Y.; JOHNSON, N.; MULLER, T.; CONZEL, M.; ANN, K.K.; TORDO, N.; FOOKS, A.R. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 1302-1314, 2007.
- MARSTON, D.A.; MCELHINNEY, L.M.; ELLIS, R.J.; HORTON, D.L.; WISE, E.L.; LEECH, S.L.; DAVID, D.; LAMBALLERIE, X.; FOOKS, A.R. Next generation sequencing of viral RNA Genomes. *BMC Genomics*, v. 14, p. 444, 2013.
- NAULT, L.R.; STYER, W.E.; KNOKE, J.K.; PITRE, H. N. Semipersistent transmission of leafhopper-borne *Maize chlorotic dwarf virus*. *Journal of Economic Entomology*, v. 66, p.1271-1273, 1973.
- PRICE, M.N.; DEHAL, P.S.; ARKIN, A.P. Computing large minimum-evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution*, v. 26, p. 1641-1650, 2009.
- 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*, v. 93, p.1853-1868, 2012.
- REDDICK, B.B.; HABERA, L.F.; LAW, M.D. Nucleotide sequence and taxonomy of *Maize chlorotic dwarf virus* within the family Sequiviridae. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 1165-1174, 1997.
- ROTH, B.A.; TOWNSEND, R.; MCMULLEN, M.D. Maize chlorotic dwarf virus and resistance thereto. International Patent Publication Number WO 94.21796.1994.
- SILVA, K.N.; MELO, F.L.; ORÍLIO, A.F.; NAGATA, T.; SILVA, M.S.; FERNANDES, C.D.; FRAGOSO, R.R.; DESSAUNE, S.N.; RESENDE, R.O. Biological and molecular characterization of a highly divergent johnsongrass mosaic virus isolate from *Pennisetum purpureum*. *Archives of Virology*, v. 161, n. 7, p. 1981-1986, 2016. doi: 10.1007/s00705-016-2832-9.
- TURNBULL-ROSS, A.D.; REAVY, B.; MAYO, M.A.; MURANT, A.F. The nucleotide sequence of parsnip yellow Feck virus: a plant picorna-like virus. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 3203-3211, 1992.
- WU, Q.; WANG, Y.; CAO, M.; PANTALEO, V.; BURGYAN, J.; LI, W.X.; DING, S.W. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by Deep sequencing and a new computational algorithm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 109, p. 3938-3943, 2012.

CAPÍTULO 4: Localização subcelular das proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 de *Maize chlorotic dwarf virus*

4.1. Introdução

Em linhas gerais, a infecção viral envolve as etapas consecutivas de desencapsidação, replicação de genoma, expressão gênica, supressão de silenciamento, montagem de partícula viral e movimento viral intracelular. Esses processos são conduzidos por proteínas virais, que recrutam a maquinaria celular para promover o sucesso da infecção. As proteínas virais usualmente acumulam mais de uma função, isto é, uma única proteína viral participa de várias etapas da infecção.

Os vírus induzem alterações celulares para montar seus complexos replicativos e promover o movimento viral, de modo que a determinação da localização subcelular das proteínas pode fornecer um indicativo de função.

Na família *Secoviridae*, a maior parte das informações sobre funções de proteínas provêm de estudos com os gêneros *Nepovirus*, *Fabavirus*, *Comovirus* e *Cheravirus*. Entretanto, para o gênero *Waikavirus*, a única informação existente é da supressora de silenciamento P1 (Stewart et al., 2017), que ainda não foi completamente caracterizada. Para as demais proteínas codificadas pelo vírus, supõem-se a função de cada baseando-se na comparação de sequência de aminoácidos de proteínas homólogas conservadas dentro da família.

Para o gênero *Nepovirus*, Ritzenthaler e colaboradores (1995) demonstraram que o movimento do vírus célula-a-célula é realizado pelo tráfego das partículas virais montadas através de túbulos formados no plasmodesma pela proteína MP (proteína de movimento viral), codificada pelo RNA2 (Wieczorek e Sanfaçon, 1993). Adicionalmente, foi mostrado também que o complexo de replicação viral dos nepovirus é composto pelas proteínas X2, NTB, VPg, Pro-Pol e fatores do hospedeiro, que se

associam a membranas intracelulares (Laliberte e Sanfaçon, 2010; Nagy e Pogany, 2012), induzindo uma proliferação de vesículas membranosas no retículo endoplasmático (RE), que muitas vezes são encontrados como agregados na área perinuclear (Sanfaçon, 2013).

Para o gênero *Comovirus*, Carvalho e colaboradores (2003) demonstraram que o movimento célula-a-célula de *Cowpea mosaic virus* (CPMV) ocorre por meio da partícula viral que é translocada através de túbulos no plasmodesma formado pela proteína de movimento viral (MP) (Van lent et al., 1991). As proteínas 32K e 60K estão envolvidas na replicação viral, causando uma mudança de morfologia nas membranas do retículo endoplasmático, fazendo com que o vírus CPMV replique em associação a pequenas vesículas membranosas, que são formadas por rearranjo das membranas intracelulares (Carette et al., 2002). Foi demonstrado também que a CPS (Small Coat protein) do vírus CPMV foi definida como proteína supressora do silenciamento de gênico pós-transcricional, e que a porção C-terminal da proteína é particularmente importante para a supressão do silenciamento gênico (Cañizares et al., 2004).

Para o gênero *Fabavirus*, foi demonstrado que a proteína VP37 é a proteína de movimento de *Broad bean wilt virus 2* (BBWV 2). A proteína fusionada a GFP (GFP-VP37) localizou-se de forma perinuclear e pontualmente na parede celular e no retículo endoplasmático em *N. benthamiana* e em células de BY-2 (Célula de tabaco BY-2). Estudos de deleções na porção C-terminal da proteína VP37 indicaram que essa região é essencial para a localização na parede celular. Usando ensaios de Fluorescência Bimolecular Complementar (BiFC), a proteína VP37 interagiu especificamente com a proteína CPS. Essa associação sugere que a CPS está envolvida no movimento célula-a-célula e que a capacidade de formação do complexo VP37-CPS pode desempenhar um papel importante nesse processo, direcionando o vírus para o Plasmodesma (Liu et al., 2009).

Por último, para o gênero *Cheravirus*, Yoshikawa e colaboradores (2006) mostraram que a expressão em células de tabaco de GFP fusionado com a proteína MP de 42 kDa é capaz de facilitar o tráfego de célula a célula do GFP. A análise da deleção de mutantes das proteínas MP, Vp24, Vp20 e Vp25, usando um vetor de expressão do vírus ALSV, indicou que a MP e as três proteínas da capa (Vp24, Vp20, Vp25) são todas indispensáveis para o movimento célula-a-célula do vírus. Por meio de microscopia eletrônica, observou-se um acúmulo de estruturas semelhantes a partículas virais que passaram através dos plasmodesmas. Estes resultados demonstram que ALSV se move de célula-a-célula como partícula viral (Yoshikawa et al., 2005).

Com isso, o objetivo geral deste trabalho foi co-localizar as proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 com marcadores de organela em folhas *Nicotiana benthamiana*, utilizando microscópio confocal a laser, visando fornecer os primeiros indícios das possíveis funções biológicas das proteínas mencionadas anteriormente.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Predição de localização subcelular

As predições da localização subcelular das proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 foram realizadas utilizando os programas online Plant-mPloc [<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>], Wolf Psort [<https://wolfsort.hgc.jp/>], Target P [<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>], cNLS MAPPER [http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi], NetNES [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>] e YLoc [<https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/yloc/webloc.cgi>]. Com base nessa predição *in silico* (Tabela 4.1), os marcadores de organela foram selecionados para uso na metodologia de co-localização.

Tabela 4.1: Predição de localização subcelular das proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 do vírus MCDV

Proteína	Localização
P1	Retículo Endoplasmático, Núcleo e Citoplasma
CP1	Mitocôndria e Núcleo
CP2	Núcleo, Mitocôndria e Citoplasma
CP3	Núcleo, Mitocôndria e Citoplasma

4.2.2. Amplificação dos genes virais que codificam para as proteínas P1, CP1, CP2 e CP3.

Folhas do Híbrido de *Brachiaria S73=3022* com sintomas virais foram maceradas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando-se o *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante.

O cDNA foi sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa Super Script IV (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Os genes foram amplificados por PCR com a enzima Phusion High-Fidelity DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific) utilizando os pares de *primers* específicos listados na Tabela 4.2. Os *primers* foram desenhados seguindo as recomendações do fabricante do sistema Gateway® Technology (Thermo Fisher Scientific), onde foram adicionados sítios de recombinação *attBs* nos pares de oligonucleotídeos para a clonagem, em sítio com fase aberta de leitura de eGFP. Para cada gene, foram inseridos nucleotídeos para manutenção da fase de leitura e sem códon de terminação. Os produtos das PCR (Figura 4.1) foram purificados do gel de agarose seguindo instruções do kit ilustra GFX PCR DNAGel Band Purification (GE Healthcare).

Tabela 4.2: Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações. Reações de PCR adicionaram os sítios de recombinação (attBs) para sistema Gateway® Technology (Thermo Fisher Scientific)

Proteínas	Oligonucleotídeos	Sequencias 5' 3'
P1	MCDVP1:GFP_ForN	attB1 -TCTAGTGGTTCACAAACGAA
	MCDVP1:GFP_RevN	attB2 -CTGCTTCTTAGCTTGTGTGGCTTT
CP2	MCDVCP2:GFP_ForN	attB1 -TCCGGGACAACCATAGTCAATAAT
	MCDVCP2:GFP_RevN	attB2 -TATGTAGACAAATTGACAGAAATT
CP3	MCDVCP3:GFP_FORN	attB1 -TATGTAGACAAATTGACAGAAATT
	MCDVCP3:GFP_REVN	attB2 -TTGTGATACAAGCTCACGGACATT
CP1	MCDVCP1:GFP_FORN	attB1 -GTGAGCTTGGGCTTCTCTCTGAGG
	MCDVCP1:GFP_REVN	attB2 -CTGCGCAACTGAATTGACCAAGGC

attB1-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAGGAGATAGAACCATG

attB2-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT

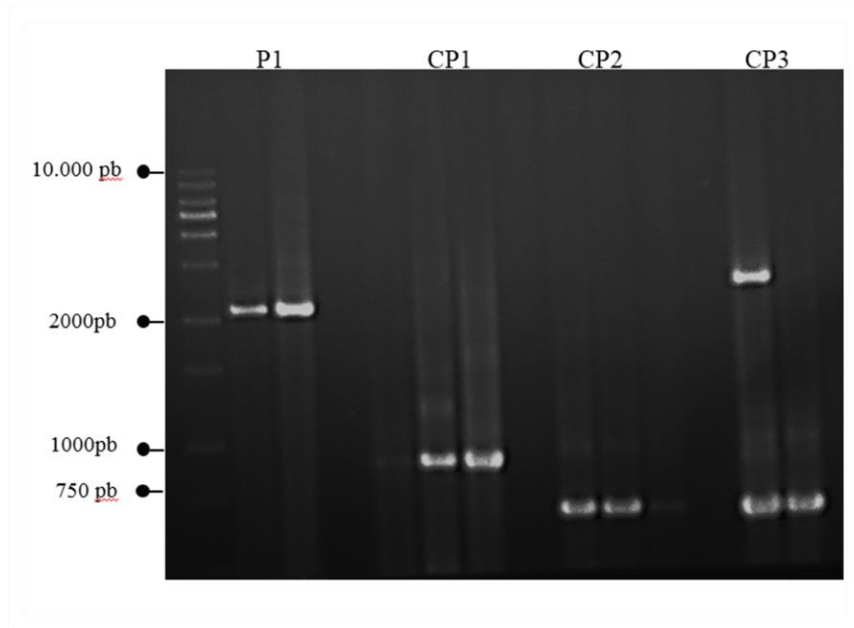


Figura 4.1: RT-PCR de fragmentos correspondente as proteínas de MCDV-BR em estudo. Foram realizadas ampliações dos fragmentos gênicos, que foram separados e visualizados por eletroforese em gel de agarose: P1 (2.090 pb), CP1 (837 pb), CP2 (630 pb) e CP3 (606 pb). Os sítios attBs de recombinação no vetor de entrada pDONR 207 foram adicionados pelos oligonucleotídeos. Marcador de massa molecular 1kb Ladder Ludwig.

4.2.3. Clonagem no vetor de entrada pDONR 207

Após a amplificação por meio de RT-PCR, no qual foram adicionados os sítios de recombinação, a clonagem no vetor de entrada pDONR 207 (Figura 4.2) foi realizada utilizando-se aproximadamente 480 ng de cada fragmento gênico, 1 µl de BP clonase e 1 µl (150 ng) do vetor pDONR 207, incubando a 25 °C por 16 h em termociclador. Posteriormente, foi adicionado 1 µl de Proteinase K na reação, permanecendo a 37 °C por 10 min no termociclador. Após a recombinação, os vetores usados para transformar *E. coli* da linhagem DH10B por eletroporação de acordo com Sambrook & Russel (2000). Para confirmar a clonagem, os plasmídeos recombinados foram digeridos com enzima de restrição *EcoRV* (Promega) e sequenciados via método Sanger na empresa Macrogen (Coréia do sul).

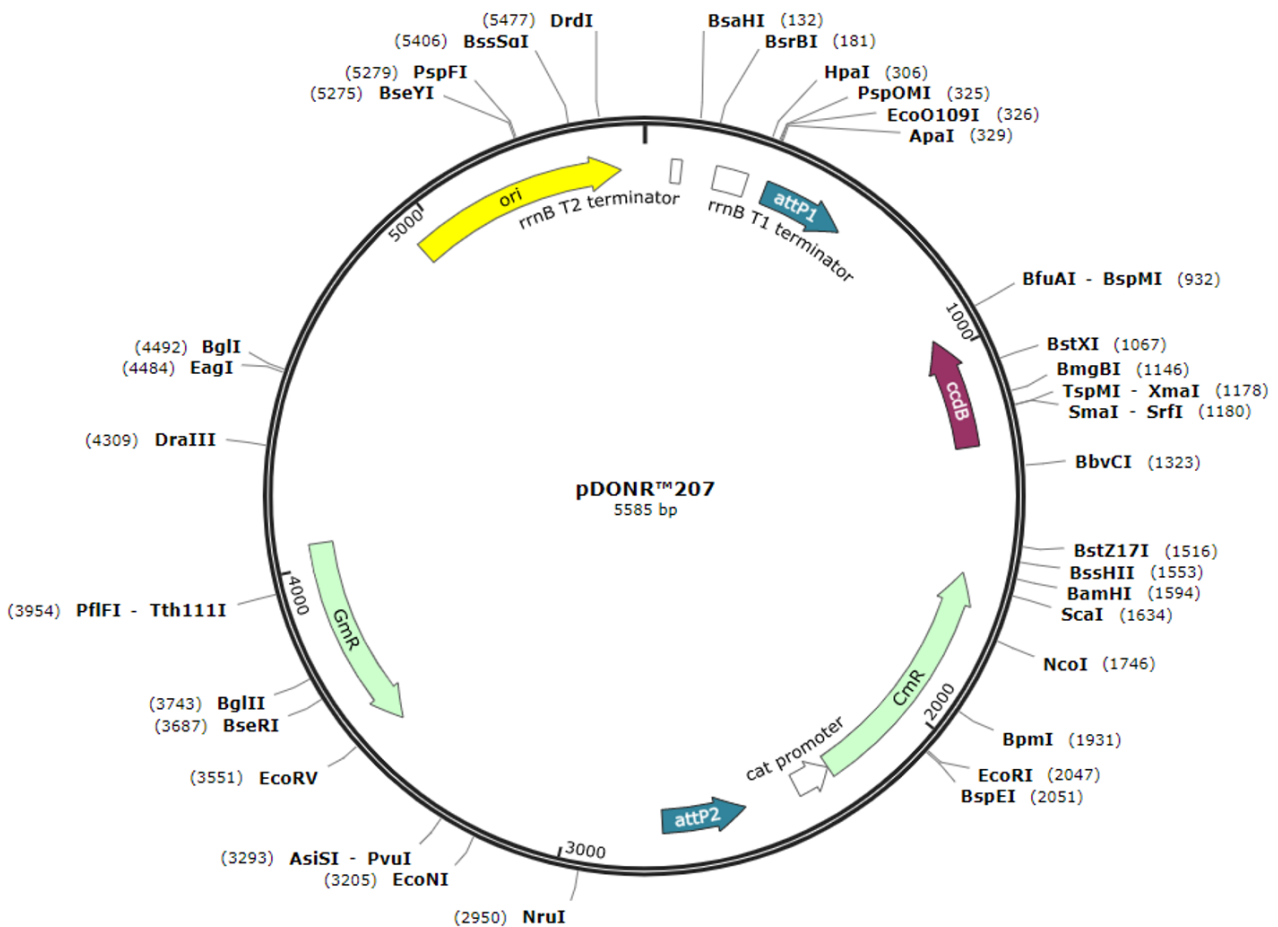


Figura 4.2: Esquema representativo do vetor de entrada pDONR207. Esse vetor foi utilizado para recombinação por sistema Gateway® Technology (Thermo Fisher Scientific) para clonagem dos genes P1, CP1, CP2 e CP3 de MCDV.

4.2.4. Clonagem no vetor de destino pK7FWG2

Após a recombinação no vetor de entrada pDONR207, os genes foram recombinados no vetor de destino pK7FWG2 (Figura 4.3, que expressa a proteína alvo em fusão C-terminal com eGFP. Para a recombinação, 580 ng de DNA plasmidial, 1 µl de vetor de destino e 1 µl de LR clonase foram incubados por 16 h a 25 °C. Posteriormente, foi adicionado 1 µl de Proteinase K na reação, permanecendo a 37 °C por 10 min. Após a recombinação, os vetores foram usados para transformação em *E. coli* da linhagem DH10B por eletroporação, de acordo com Sambrook & Russel (2000). Para a confirmação da clonagem, os plasmídeos recombinados foram digeridos com enzimas de restrição *Pst*I, *Nde*I e *Eco*RV (Promega) e enviados para o sequenciamento via Sanger (Macrogen-Coréia do Sul). Após a confirmação, as construções em pK7FWG2 foram inseridas por eletroporação em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, que foram agroinfiltradas com seringa em folhas de *Nicotiana benthamiana*.

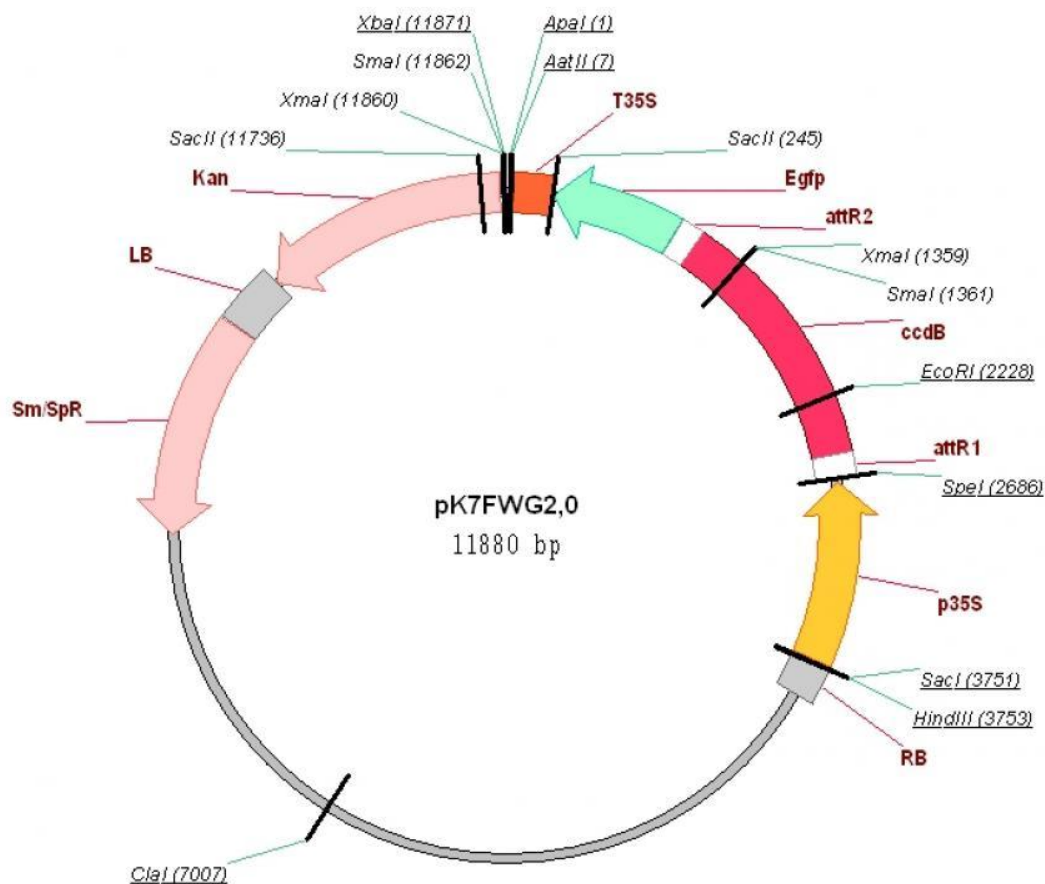


Figura 4.3: Esquema representativo do vetor de destino PK7FWG2. Esse vetor foi utilizado para recombinação por sistema Gateway® Technology (Thermo Fisher Scientific) para clonagem dos genes P1, CP1, CP2 e CP3 de MCDV.

4.2.5. Co-localização com marcadores fluorescentes para organelas

A localização subcelular observada pela expressão de proteínas fusionadas com eGFP foi confirmada pela co-localização com marcadores fluorescentes de diferentes organelas disponíveis comercialmente, adquiridos no site TAIR (The Arabidopsis information Resource) e desenvolvido por Nelson et al (2007).

Combinações de pares entre as construções pK7FWG2 para expressão de proteínas virais (P1, CP1, CP2 e CP3) em fusão com eGFP e as construções para expressão de marcadores de organela (ER-mCHERRY, MT-mCHERRY, PX-mCHERRY ou G-mCHERRY (Neolson et al., 2007) foram agroinfiltradas juntamente

em plantas de *N. benthamiana*. A visualização em microscópio confocal a laser (Leica TCS SP8) foi realizada 48 h após a agroinfiltração.

4.2.6. Agroinfiltração em plantas de *Nicotiana benthamiana*

Plantas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com suspensão de combinações de duas construções P1/CP1/CP2/CP3- PK7FWG2 e marcadores de organela para co-expressão em folhas *N. benthamiana*. Os controles foram agroinfiltrados com clones individuais, ou seja, com uma única construção. Em todas as agroinfiltrações foi utilizada a proteína supressora HC-PRO, previamente clonada no vetor binário pMOG8000, cedido gentilmente pelo Dr. Jesús Angel Sánchez-Navarro- Universidad Politécnica de Valencia-CSIC-Espanha.

Para a agroinfiltração foi centrifugando 4 ml de agrobactérias cultivadas por 48 h a 28 °C. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso em 3 ml de tampão de agroinfiltração (10 mM MgCL₂ + MES 10 mM pH 5,6; acetosyringone 150 µM) e a suspensão foi ajustada para uma densidade ótica OD_{600 nm} de 1.0. Usando seringa sem agulha, a amostra foi infiltrada na face abaxial da folha. Dois dias após a agroinfiltração (dpa), as folhas foram coletadas e analisadas em microscópio confocal a laser (Leica TCS SP8), as moléculas de GFP e mCHERRY foram excitadas no espectro de 488 nm e 552 nm. As observações foram feitas utilizando-se lentes objetivas de 20X, 40X e 63X.

4.3. Resultados e Discussão

As proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 de MCDV-BR foram utilizadas para determinar a localização subcelular em tecidos agroinfiltrados de *N. benthamiana*, para predição das prováveis funções dessas proteínas no processo infectivo, que até o momento são desconhecidas.

MCDV-BR codifica outras proteínas além das estudadas nessa etapa do trabalho, porém, não foram incluídas nesse primeiro estudo, devido a indefinição dos sítios de clivagem presentes na poliproteína viral. Contudo, experimentos posteriores serão desenvolvidos com essas proteínas adicionais para o melhor entendimento do processo de infecção por MCDV-BR.

Genes candidatos das proteínas virais P1, CP1, CP2 e CP3 foram fusionadas na extremidade amino (N-Terminal) de eGFP, correspondendo na fusão da extremidade carboxil (C-Terminal) de cada fusão proteica obtida. As construções gênicas foram transferidas para *Agrobacterium tumefaciens* visando a agroinoculação em folhas de *N. benthamiana*, permitindo dessa maneira a expressão transiente das proteínas virais em estudo.

4.3.1. Localização citoplasmática das proteínas P1 e CP3

A predição *in silico* indicou localização no núcleo, retículo endoplasmático e citoplasma para P1 de MCDV-BR. Já para CP3 de MCDV-BR, a predição foi para mitocôndria, núcleo e citoplasma. Por meio de expressão transiente, essas proteínas apresentaram acúmulo em forma de pequenos grânulos no citoplasma das células, que constitui um fenótipo citopatológico típico de proteínas de movimento (MP), que são direcionadas ao plasmodesma (Figura 4.4 e 4.5). As proteínas P1 e CP3 também foram observadas como dois pontos fluorescentes de tamanho similar, sugerindo uma possível associação destas proteínas com o plasmodesma (Figura 4.7 A e 4.7 B). Esta localização foi consistente, observada em todas as repetições do experimento. Além de possivelmente estar envolvida no movimento célula-a-célula do vírus, a P1 também atua como supressora de silenciamento gênico, segundo demonstrado por Stewart e colaboradores (2017).

Como controle dos ensaios de localização, foi utilizado o vetor binário pK7FWG2 vazio (gentilmente cedido pelo professor Dr. Tatsuya Nagata-UNB-Brasília) (Figura 4.6), sem nenhuma fusão, para o qual foi observado que a proteína fluorescente eGFP apresentou típica localização dispersa no citoplasma e no núcleo, provavelmente devido ao seu pequeno tamanho ou enovelamento tridimensional (Tanz et al., 2013). As imagens de campo claro foram obtidas para auxiliar na identificação da localização da fluorescência na célula.

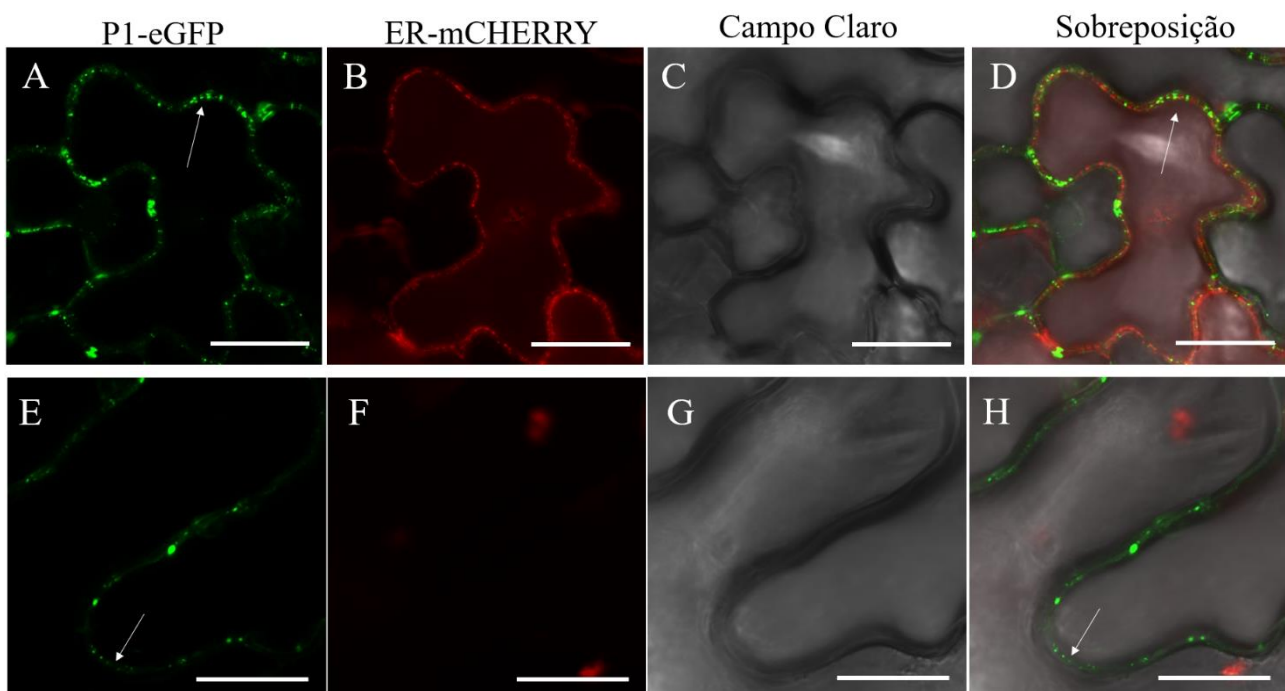


Figura 4.4: Visualização em microscópio confocal leica SP8 da expressão transiente da proteína P1 do MCDV-BR fusionada com eGFP em folhas de *N. benthamiana* 2 dpa. **A e E:** Observação da localização da proteína P1 fusionada a eGFP no citoplasma (seta branca). Presença de pequenos grânulos no citoplasma (seta branca). **B:** Marcador de retículo endoplasmático. **C e G:** Campo claro. **D e H:** Sobreposição das imagens A-B-C e E-F-G. **F:** Autofluorescência de cloroplasto. Barra de 20 μm .

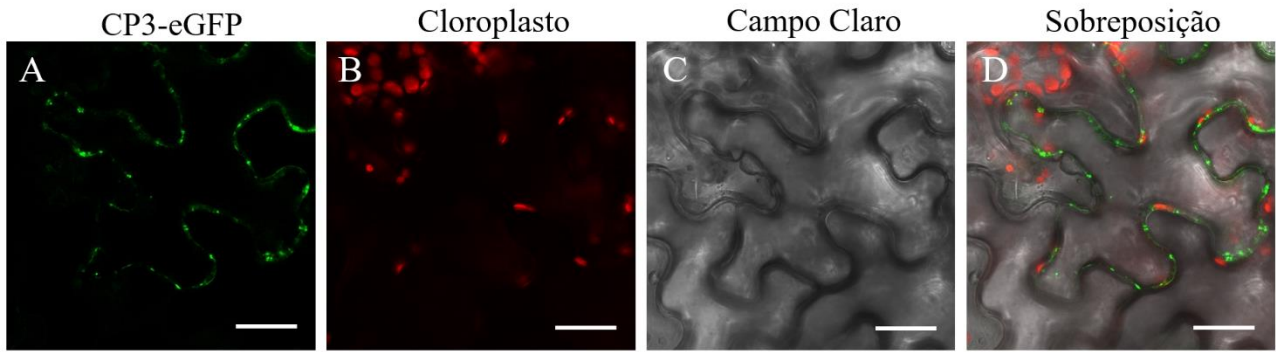


Figura 4.5: Visualização em microscópio confocal leica SP8 da expressão transitente da proteína CP3 do MCDV-BR fusionada a eGFP em folhas de *N. benthamiana* 2 dpa. **A e D:** Observação da localização da proteína CP3 fusionada a eGFP no citoplasma próximo a parede celular (seta branca). Observação da presença de pequenos grânulos no citoplasma próximo a parede celular (seta branca). **B:** Autofluorescência de cloroplasto. **C:** Campo claro. **D:** Sobreposição das imagens A-B-C. Barra de 20 μm

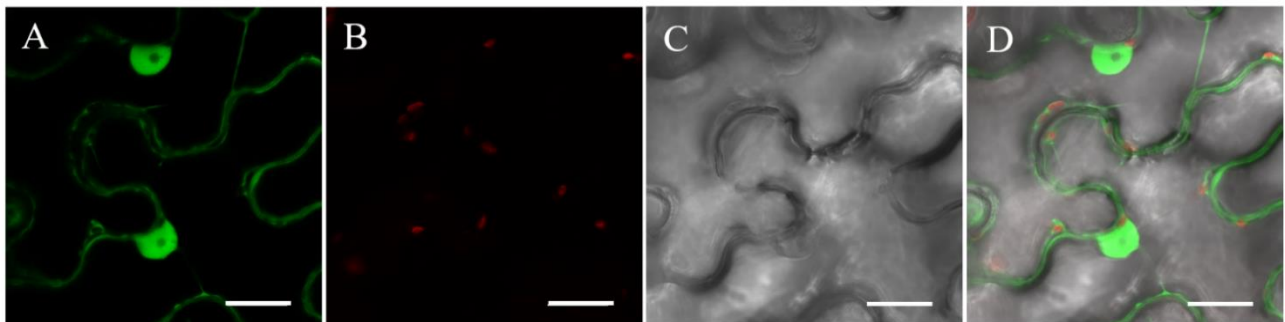


Figura 4.6: Visualização em microscópio confocal leica SP8 da expressão transitente do vetor binário pK7FWG2 vazio expressando GFP em folhas de *N. benthamiana* 2 dpa utilizado como controle. **A:** Localização da proteína fluorescente eGFP dispersa no citoplasma e no núcleo. **B.** Autofluorescência de cloroplasto. **C:** Campo claro. **D:** Sobreposição das imagens A-B-C. Barra de 20 μm

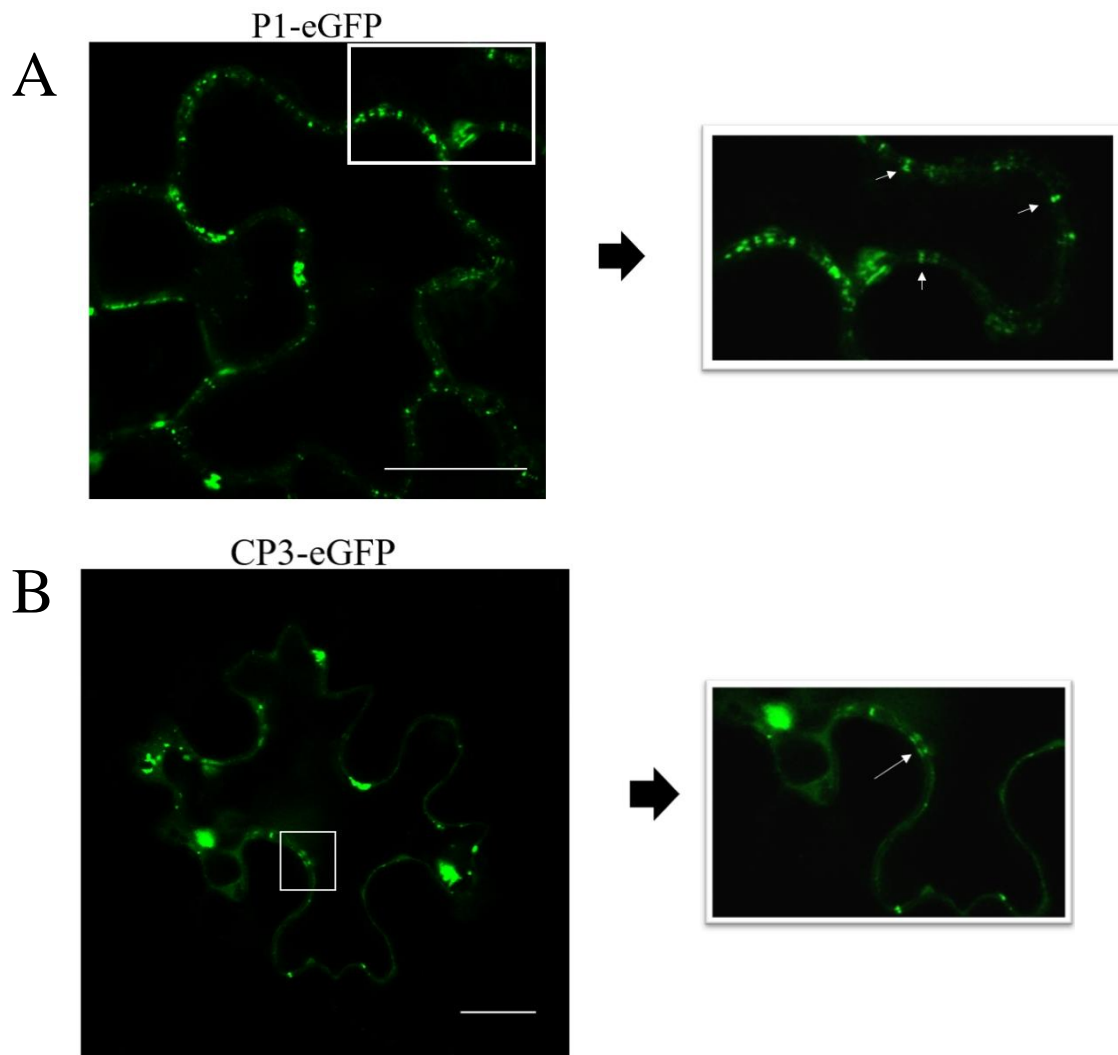


Figura 4.7: Visualização em microscópio confocal leica SP8 da expressão transiente das proteínas P1(A) e CP3(B) do vírus MCDV-BR fusionadas a eGFP agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* 2 dpa. **A e B:** Observação de pequenos grânulos no citoplasma próximo a parede celular (setas brancas)

Na família *Secoviridae*, as proteínas de movimento que foram identificadas pertencem aos gêneros *Nepovirus* (*Tomato ringspot virus*), *Comovirus* (*Cowpea mosaic virus*), *Fabavirus* (*Broad bean wilt virus 1*) e *Cheravirus* (*Cherry rasp leaf virus*). Essas quatro MPs se localizaram no plasmodesma (PD) e formaram túbulos, que são modificações menores do plasmodesma realizada por essas MPs para facilitar a movimentação viral. Alinhamentos de sequência de aminoácidos realizados entre as

quatro MP dos vírus acima mencionados com a P1 e CP3 de MCDV-BR não revelou nenhuma similaridade significativa entre as proteínas, apesar desses vírus pertencerem a mesma família e por analogia, apresentarem aparentemente a mesma localização celular. Ressaltamos nessas comparações que o motivo conservado LPL, característico de proteínas de movimento viral, foi encontrado na posição 368-370 da proteína P1 do MCDV-BR, sugerindo que esta proteína possivelmente seja a MP do vírus MCDV. Este motivo também foi identificado na MP de *Apple latent spherical virus*, pertencente ao gênero *Cheravirus*, família *Secoviridae* (Chunjiang et al., 2000).

Vale mencionar, que uma distribuição de fluorescência semelhante as proteínas P1 e CP3 foi observada para algumas proteínas eucarióticas presente no plasmodesma, como a PDLP1 (Amari et al., 2010), AtBG2 (Zavaliev et al., 2013), PAPK1 (Lee et al., 2005), Calreticulina AtCRT2 (Chen et al., 2005), Miosina VIII-B e Miosina XI-F (Amari et al., 2014). Tais proteínas eucarióticas mencionadas residem ou estão associadas ao plasmodesma, sendo que já foram identificadas suas interações com proteínas de movimento viral.

Essas evidências permitem sugerir que a P1 e CP3 do MCDV-BR estejam envolvidas no movimento viral, entretanto, experimentos adicionais serão necessários para demonstrar o mecanismo de ação destas proteínas.

4.3.2. Localização da proteína CP1 nas mitocôndrias.

A predição *in silico* da localização subcelular da proteína CP1 indicou a presença de um peptídeo sinal (KRWSH) que direciona essa proteína para a mitocôndria (Horton et al., 2007). A possível associação da CP1 com a mitocôndria foi avaliada realizando a co-expressão da proteína CP1 fusionada ao eGFP com marcador específico de mitocôndria (COXIV-mCHERRY) (Neolson et al., 2007).

Em plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com a fusão CP1-eGFP, observou-se a presença de agregados fluorescentes distribuídos no citoplasma. A sobreposição da CP1 com o marcador de mitocôndria indicou uma possível associação da proteína com essa organela (Figura 4.8 A-H).

Este padrão de localização foi descrito para outros vírus de (+) ssRNA de diferentes famílias. Como exemplo, podemos citar os vírus *Melon necrotic spot virus* e *Carnation italian ringspot virus* (Gómez-Aix et al., 2014; Di-Franco et al., 1984) pertencentes a família *Tombusviridae*, e o *Beet necrotic yellow vein virus* da família *Benyviridae* (Erhardt et al., 2001). Para esses vírus foi demonstrado que as proteínas localizadas na mitocôndria fazem parte do complexo de replicação viral, promovendo rearranjo da membrana do hospedeiro. Estas modificações incluem formações de vesículas em diferentes organelas (Grangeon et al. 2012). Este rearranjo serviria para ancorar o complexo replicativo e fornecer um isolamento dessas estruturas contra o sistema de defesa das plantas (Laliberté e Sanfaçon, 2010).

Essa é a primeira evidência de associação da proteína CP1 de MCDV com a mitocôndria na família *Secoviridae*. No entanto, experimentos complementares serão realizados para comprovar essa possível associação.

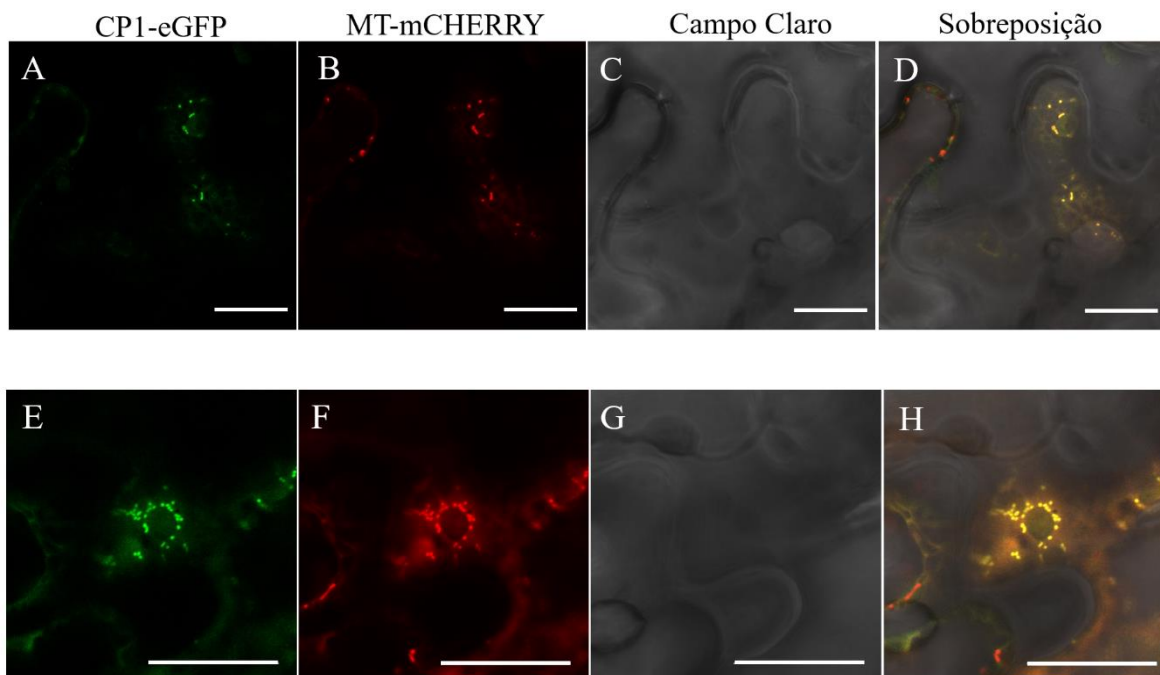


Figura 4.8: Visualização em microscópio confocal leica SP8 da expressão transitente da proteína CP1 do MCDV-BR fusionada a eGFP em folhas de *N. benthamiana* 2 dpa. **A-H:** Co-expressão da proteína CP1 com o marcador de mitocôndria. **A e E:** Observação de expressão da proteína CP1 formando agregados fluorescentes distribuídos no citoplasma. **B e F:** Expressão do marcador de mitocôndria MT-Mcherry. **C e G:** Campo Claro. **D e H:** Sobreposição das imagens A-B-C e E-F-G.

4.3.3. Localização da proteína CP2 e CP3 no núcleo.

A predição *in silico* de CP2 e CP3 do MCDV-BR indicou localização na mitocôndria e no citoplasma. Entretanto, foi observado que as fusões CP2-eGFP e CP3-eGFP formaram agregados no nucleoplasma (Figura 4.9 B e C). Apesar da localização nuclear da proteína CP2, a análise *in silico* não indicou nenhum sinal de endereçamento nuclear (NSL) conhecido. Por outro lado, para a proteína CP3 foi identificado o domínio NSL (KRK) (Cheng et al., 2001) na posição 90-93 da proteína, observação que poderia corroborar a localização nuclear.

Como controle dos experimentos foi utilizado o vetor binário pK7FWG2 vazio, em que o GFP livre ficou distribuído no citoplasma e também no núcleo (Figura 4.8A). As observações na microscopia confocal demonstraram que as fusões CP2-eGFP e CP3-eGFP que foram expressas em *N. benthamiana* não refletem o padrão de distribuição comumente observado no controle.

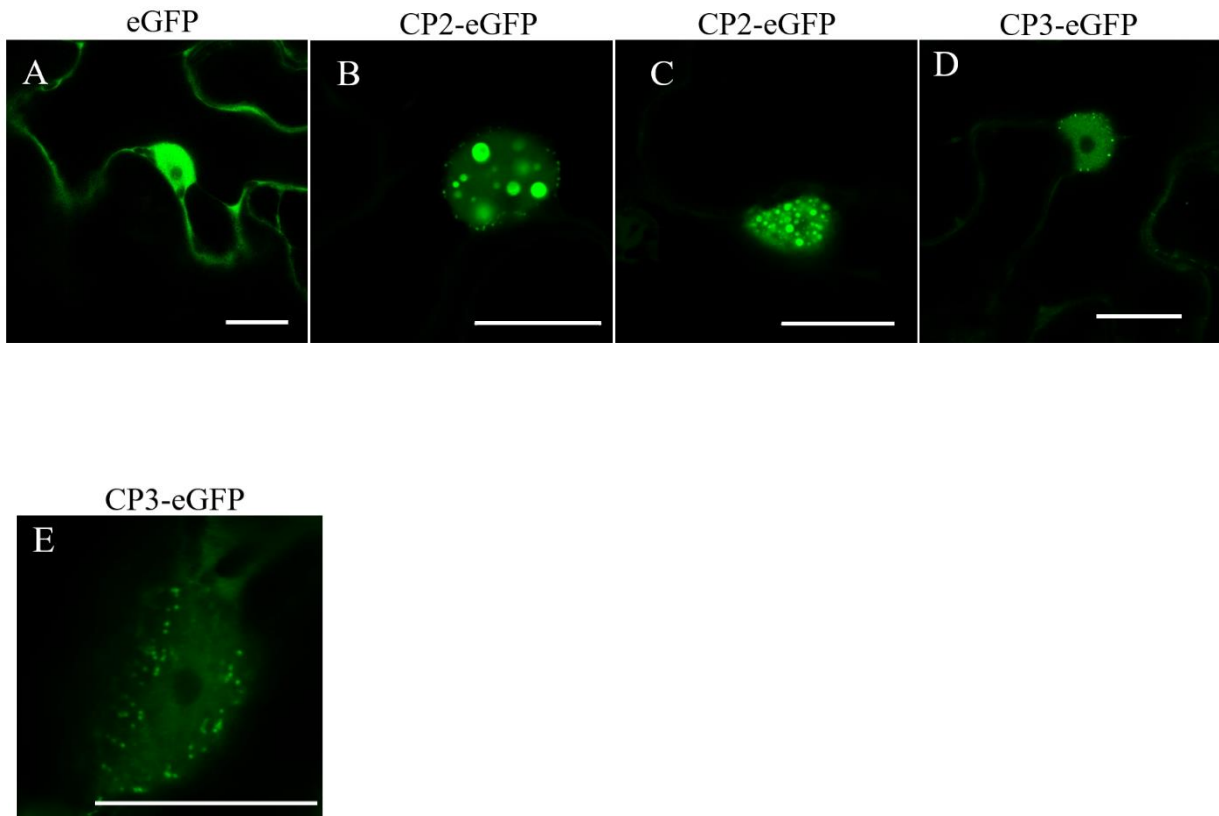


Figura 4.9: Visualização em microscópio confocal leica SP8 da expressão transiente das proteínas CP2 e CP3 fusionadas a eGFP agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* 2 dpa. **A:** Visualização em microscópio confocal da expressão transiente do vetor binário PK7FWG2 vazio expressando GFP. **B e C:** Localização da CP2 fusionada a eGFP mostrando um acúmulo em forma de agregados no nucleoplasma. **D e E:** Expressão transiente da CP3 fusionada a eGFP mostrando acúmulo em forma de agregados no nucleoplasma e na periferia do núcleo.

Estudos de localização subcelular com o geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) identificaram que a CP quando expressa sozinha é majoritariamente localizada no nucléolo, apresentado um sinal fraco no nucleoplasma. Entretanto, foram observados agregados no nucleoplasma após a agroinfiltração do clone infeccioso TYLCV e da CP, e nos ensaios de BiFC com CP e Rep. Adicionalmente, na presença do clone infeccioso, a CP co-localizou com as proteínas de *Arabidopsis* ALY4 e U3-55K, que são relacionadas a biogênese de mRNA e de rRNA e processamento de RNA, respectivamente, sugerindo que a CP pode interferir no metabolismo de RNA (Wang et al., 2017). Para outros vírus como o *Cucumber mosaic virus* (CMV), a presença de agregados proteicos no núcleo foi observada para a proteína 2b, que está envolvida na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (Lucy et al., 2000).

Algumas proteínas eucarióticas também apresentam o mesmo padrão de localização da CP2 e CP3, como a RNPS, eIF4A-III (Koroleva et al., 2009) e U3-55K (Pendle et al., 2005). Tais proteínas fazem parte do Complexo de Junção de Éxons (CJE). Após o processamento de pré-mensageiro RNA (*splicing*), com a retirada de íntron e ligação de éxons, este complexo proteico fica ligado ao RNA, majoritariamente na junção éxon-éxon. O complexo possui múltiplas funções, e as proteínas associadas a esse complexo são recrutadas em diferentes etapas da transcrição gênica, como no processamento do pré-mRNA, na exportação do RNA, na tradução e degradação do mesmo (Boehm et al., 2016). Segundo Boudreault e colaboradores (2016), infecções virais podem induzir mudanças globais no processamento alternativo de mRNAs, influenciando na expressão gênica e no sistema de defesa do hospedeiro, promovendo um ambiente ideal para replicação viral (Boudreault et al., 2016).

De maneira semelhante, algumas proteínas de vírus que infectam humanos também apresentam o mesmo padrão de localização da CP2 e CP3, como é o caso de

ICP4 de *Herpes simplex virus 1*. Foi demonstrado que esta proteína atua como fator de transcrição, ativando a expressão de genes precoces e tardios, sendo essencial no processo de infecção viral, (Aho et al., 2017).

Outra proteína que apresenta agregados no núcleo, observado por confocal em células expressando fusão com GFP, é a VP2 de *Chicken anemia virus* (CAV). Usando programas de identificação de sequências conservadas de sinalização de localização nuclear (NLS), a proteína VP2 apresentou duas regiões com NLS, sendo uma contínua e outra bipartida. Ensaio de mutação sítio-dirigida, alterando aminoácidos críticos dessas duas NLS, demonstraram redução percentual de endereçamento nuclear, chegando mesmo a não localização em núcleo, apenas citoplasma (Cheng et al., 2001). Devido a interação desta proteína com a MCM3 (Proteína de manutenção de mini-cromossomo), foi associada a função de VP2 na replicação do DNA viral.

Estudos subsequentes deverão ser realizados para desvendar as funções desempenhadas por CP2 e CP3 do MCDV-BR, porém, devido a distribuição peculiar apresentada por essas proteínas formando agregados no núcleo, estas podem estar envolvidas na interação com a cromatina, na biogênese de mRNA e rRNA, na atuação como fator de transcrição, no processamento do mRNA do hospedeiro, na interação com as proteínas de importação e exportação nuclear e na supressão do silenciamento gênico.

4.4. Conclusões e Perspectivas

A localização subcelular das proteínas P1, CP1, CP2 e CP3 do MCDV-BR realizada neste trabalho é a primeira evidência experimental do comportamento dessas proteínas. No entanto, ainda são necessários experimentos adicionais e complementares para realizar a validação da localização dessas proteínas. Como ensaios de imunomarcação com anticorpos específicos com visualização em microscópio de transmissão poderiam corroborar as observações obtidas nos experimentos de co-localização.

Uma limitação nos ensaios de sublocalização usando proteínas fluorescentes reside na fusão (N ou C-terminal) das proteínas em estudo com versões da proteína GFP, fato que, eventualmente, pode interferir no enovelamento correto da proteína alvo, podendo resultar em alterações na sua localização e função. Devido a este fato, os ensaios posteriores serão realizados fusionando eGFP no N-terminal das proteínas em estudo.

Para confirmar as funções das proteínas virais, deve ser realizada a construção de um clone infectivo de MCDV-BR. Além disso, ensaios de interação proteína-proteína, com proteínas virais e proteínas do hospedeiro potencialmente envolvidas nos processos de interação vírus/hospedeiro podem ser realizados utilizando as técnicas de BiFC e Y₂H, visando compreender mais detalhadamente o processo de infecção viral.

Finalmente, experimentos de localização subcelular das proteínas virais deve ser realizados em plantas de *Brachiaria brizantha*, hospedeira original onde o vírus foi isolado pela primeira vez, a fim de confirmar os resultados obtidos em *N. benthamiana*.

4.5. Referência bibliográfica

- AHO, V.; MYLLYS, M.; RUOKOLAINEN, V.; HAKANEN, S.; MANTYLA, E.; VIRTANEN, J.; HUKKANEN, V.; KUHN, T.; TIMONEN, J.; MATTILA, K.; LARABELL, A.C.; VIHINEN-RENATA, M. Chromatin organization regulates viral egress dynamics. *Scientific Reports*, v. 7, p. 3692, 2017. doi:10.1038/s41598-017-03630-y
- AMARI, K.; BOUTANT, E.; HOFMANN, C.; SCHMITT-KEICHINGER, C.; FERNANDEZ-CALVINO, L.; DIDIER, P.; JÉROME, A.; MUTTERER, J.; THOMAS, C.L.; HEINLEIN, M.E.; LY, Y.; MAULE, A.J.; RITZENTHALER, C. A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 9, e1001119, 2010. doi:10.1371/journal.ppat.1001119. 2010.
- AMARI, K.; DI DONATO, M.; DOLJA, V.V.; HEINLEIN, M. Myosins VIII and XI play distinct roles in reproduction and transport of Tobacco mosaic virus. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 10, e1004448, 2014. doi:10.1371/journal.ppat.1004448
- BOEHM, V.; GEHRING, N.H. Exon junction complexes: supervising the gene expression assembly line. *Trends in Genetics*, v. 32, p. 724-735, 2016. doi: 10.1016/j.tig. 2016.09.003
- BOUDREAULT, S.; MARTENON-BRODEUR, C.; CARON, M.; GARANT, J-M.; TREMBLAY, M.P.; ARMERO, V. Global profiling of the cellular alternative RNA splicing landscape during virus-host interactions. *PLoS ONE*, v. 11, n. 9, e0161914, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0161914
- CAÑIZARES, M.C.; TAYLOR, K.M.; LOMONOSSOFF, G.P. Surface-exposed C-terminal amino acids of the small coat protein of Cowpea mosaic virus are required for suppression of silencing. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 3431-3435, 2004.
- CARETTE, J.E.; VAN LENT, J.; MACFARLANE, S.A.; WELLINK, J.; VAN KAMMEN, A. Cowpea mosaic virus 32- and 60-kilodalton replication proteins target and change the morphology of endoplasmic reticulum membranes. *Journal of Virology*, v. 76, p. 6293-6301, 2002.
- CARVALHO, C.M.; WELLINK, J.; RIBEIRO, S.G.; GOLDBACH, R.W.; VAN LENT, J.W. The C-terminal region of the movement protein of Cowpea mosaic virus is involved in binding to the large but not to the small coat protein. *Journal of General Virology*, v. 84, n. 8, p. 2271-2277, 2003.
- CHEN, M.; TIAN, G.; GAFNI, Y.; CITOVSKEY, V. Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiology*, v. 138, p. 1866-1876, 2005.
- CHENG, J.H.; SHEU, S.C.; LIEN, Y.Y.; LEE, M.S. Identification of the NLS and NES motifs of VP2 from chicken anemia virus and the interaction of VP2 with mini-chromosome maintenance protein 3. *BMC Veterinary Research*, v. 8, n. 15, 2012.
- CHUNJIANG, L; NOBU YOSHIKA.WA; TSUYOSHI. T; TSUTAE. I; KOUJI. Y; HIROKI. K. Nucleotide sequence and genome organization of Apple latente spherical virus: a new virus classified into the Family Comoviridae. *Journal of General Virology*, 81, 541-547, 2000.
- DI FRANCO, A.; MARTELLI, G.P. Ultrastructure and origin of cytoplasmic mitochondria. *Molecular Plant Microbe Interact*, v. 28, p. 387-397, 2015. doi: 10.1094/MPMI-09-14-0274-R
- ERHARDT, M.; DUNOYER, H.P.; GUILLEY, K.R.; JONARD, G.; BOUZOUBAA, S. Beet necrotic yellow vein virus particles localize to mitochondria during infection. *Virology*, v. 286, p. 256-262, 2001.
- GÓMEZ-AIX, C.; GARCÍA-GARCÍA, M.; ARANDA, M.A.; SÁNCHEZPINA, M.A. Melon necrotic spot virus replication occurs in association with altered mitochondria.

- Molecular Plant Microbe Interaction, v. 28, p. 387-397, 2015. doi: 10.1094/MPMI-09-14-0274-R
- GRANGEON, R.; JIANG, J.; LALIBERTÉ, J.F. Host endomembrane recruitment for plant RNA virus replication. *Current Opinion in Virology*, v. 2, p. 683-690, 2012.
- HORTON, P.; PARK, K.; OBAYASHI, T.; FUJITA, N.; HARADA, H.; ADAMS-COLLIER, C.J.; NAKAI, K. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, Jul 35 (Web Server issue): W585-W587, 2007. doi:10.1093/nar/gkm259
- KOPEK, B.G.; PERKINS, G.; MILLER, D.J.; ELLISMAN, M.H.; AHLQUIST, P. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biology*, v. 5, p. e220, 2007.
- KOROLEVA, O.A.; CALDER, G.; PENDLE, A.F.; KIM, S.H.; LEWANDOWSKA, D.; SIMPSON, C.G.; JONES, I.M.; BROWN, J.W.S.; SHAWA, P.J. Dynamic behavior of Arabidopsis eIF4A-III, putative core protein of Exon Junction Complex: Fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *The Plant Cell*, v. 21, p. 1592-1606, 2009.
- LALIBERTE, J.F.; SANFAÇON, H. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annual Reviews of Phytopathology*, v. 48, p. 69-91, 2010.
- LEE, J.Y.; TAO, K.; YOO, B.C.; BEN-NISSAN, G.; KIM, D.J.; LUCAS, W.J. Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell*, v. 17, p. 2817-283, 2005.
- LIU, C.; MENG, C.; XIE, L.; HONG, J.; ZHOU, X. Cell-to-cell trafficking, subcellular distribution, and binding to coat protein of *Broad bean wilt virus 2* VP37 protein. *Virus Research*, v. 143, p. 86-93, 2009.
- LUCY, A.P.; GUO, H.S.; LI, W.X.; DING, S.W. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *The EMBO Journal*, v.19, n.7, p. 1672-1680, 2000.
- NAGY, P.D.; POGANY, J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, p. 137-149, 2012.
- NELSON, B.K.; CAI, X.; NEBENFÜHR, A. A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal*. v. 51, p. 1126-1136, 2007.
- OTULAK, K.; CHOUDA, M.; BUJARSKIB, J.; GARBACZEWSKA, G. The evidence of Tobacco rattle virus impact on host plant organelles ultrastructure. *Micron*, v. 70, p. 7-20, 2015. doi: 10.1016/j.micron.2014.11.007
- PENDLE, A.F.; CLARK, G.P.; BOON, R.; LEWANDOWSKA, D.; LAM, Y.W.; ANDERSEN, J. Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Molecular Biology of the Cell*, v. 16, p. 260-269, 2005. doi: 10.1091/mbc.E04-09-0791
- RITZENTHALER, C.; SCHMIT, A.C.; MICHLER, P.; STUSSI-GARAUD, C.; PINCK, L. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules in vivo. *Molecular Plant Microbe Interaction*, v. 8, p. 379-387, 1995.
- SANFAÇON, H. Investigating the role of viral integral membrane proteins in promoting the assembly of nepovirus and comovirus replication factories. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, article 313, 2013.
- STEWART, L.R.; JARUGULAB, S.; ZHAOB, Y.; QUB, F.; MARTY, M. Identification of a maize chlorotic dwarf virus silencing suppressor protein. *Virology*, v. 504, p. 88-95, 2017.

- TANZ, S. K., CASTLEDEN, I., SMALL, I. D., E MILLAR, A. H. Fluorescent protein aging as a tool to define the subcellular distribution of proteins in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. 214, p. 1-9, 2013.
- WANG, L.; TAN, H.; WU, M.; JIMENEZ-GONGORA, T.; TA, L.; LOZANO-DURAN, R. Dynamic virus-dependent subnuclear localization of the capsid protein from a Geminivirus. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, 2165, 2017.
- WIECZOREK, A.; SANFAÇON, H. Characterization and subcellular localization of tomato ringspot nepovirus putative movement protein. *Virology*, v. 194, p. 734-742, 1993.
- YOSHIKAWA, N.; OKADA, K.; ASAMUMA, K.; WATANABE, K.; IGARASI, A.; LI, C.; ISOGAI, M. A movement protein and three capsid proteins are all necessary for the cell-to-cell movement of apple latent spherical cheravirus. *Archives of Virology*, v. 151, n. 5, p. 837-848, 2006. doi:10.1007/s00705-005-0689-4
- ZAVALIEV, R.; LEVY, A.; GERA. A.; EPEL, L.B. Subcellular dynamics and role of Arabidopsis β -1,3-glucanases in cell-to-cell movement of Tobamoviruses. *Molecular Plant Microbe Interaction*, v. 26, n. 9, p. 1016-1030, 2013. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-03-13-0062-R>

ANEXO

Biological and molecular characterization of a highly divergent johnsongrass mosaic virus isolate from *Pennisetum purpureum*

Karina N. Silva¹ · Fernando L. Melo¹ · Anelise F. Orílio¹ · Tatsuya Nagata¹ ·
Marilia S. Silva² · Celso D. Fernandes³ · Rodrigo R. Fragoso⁴ · Suelen N. Dessaune⁴ ·
Renato O. Resende¹

Received: 14 November 2015 / Accepted: 15 March 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract The complete genome sequence (9,865 nucleotides) of a highly divergent johnsongrass mosaic virus isolate (JGMV-CNPGL) was determined using Illumina sequencing. This isolate infected 10 genotypes of gramineous plants including maize. A comparative analysis of the complete genome showed 80 % nucleotide (nt) sequence identity (86 % amino acid (aa) sequence identity) to a johnsongrass mosaic virus isolate from Australia. The coat protein (CP) identity values, however, were lower than those for the whole genome (78 % and 80 % for nt and aa, respectively) and were close to the species demarcation values (77 % nt and 80 % aa). Unexpectedly, the amino-terminal portion of CP of JGMV-CNPGL showed only 38 % sequence identity to other JGMV isolates. The biological implications of this sequence divergence remain to be elucidated.

Elephant grass (*Pennisetum purpureum*) is a perennial grass species belonging to the family *Poaceae*, which

includes maize, sorghum, wheat, rice, oat, barley, millet, brachiaria and panicum. Elephant grass, also known as napier grass, was first described in 1827 by Heinrich Schumacher in Africa, where this species originated [1]. The introduction of elephant grass into Brazil occurred in 1920, and this plant adapted to different soil types, except for poorly drained soils [2]. In the last 15 years, it has been used for feeding cattle due to its nutritional quality and yield [3]. The potential of elephant grass as a biomass source for bioethanol production has also been recognized [4].

Elephant grass is propagated by vegetative means using mature stems [3], an agricultural practice that favors the accumulation of viruses in crop plants (?references?). Until now, viruses of three genera (*Potyvirus*, *Mastrevirus*, and *Sobemovirus*) and an unclassified virus of the family *Luteoviridae* have been reported to infect elephant grass worldwide. In Brazil, johnsongrass mosaic virus has been reported recently by our research group [5].

Johnsongrass mosaic virus (JGMV) belongs to the genus *Potyvirus* (family *Potyviridae*), causing mosaic symptoms and severe yield losses in several monocot species. This virus is transmitted in a non-persistent manner by some aphid species: *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum maidis* [6, 7]. JGMV was first described in Australia as maize dwarf mosaic virus [8] and later as a johnsongrass strain of sugarcane mosaic virus based on its biological and serological properties [7, 9]. However, Shukla and Ward [9] demonstrated, based on nucleotide and amino acid sequences of the coat protein (CP), that this virus was indeed a member of a new potyvirus species, which was given the name *Johnsongrass mosaic virus*. Previous reports have demonstrated the occurrence of this virus in Australia [8, 10, 11], South America [5, 12, 13], Nigeria [14] and the USA [6, 15]. In

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-016-2832-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Renato O. Resende
rresende@unb.br

¹ Department of Cell Biology, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal 70910-900, Brazil

² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Distrito Federal, Brazil

³ Embrapa Beef Cattle, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

⁴ Embrapa Cerrado, Planaltina, Distrito Federal, Brazil

the USA, JGMV was first isolated in Texas and described as an MDMV isolate capable of infecting oat, johnsongrass and maize [6]. Now, this strain is designated as JGMV-MDO (maize dwarf oat strain) [15]. JGMV has also been reported in Venezuela infecting several varieties of maize [12, 16] and in Colombia infecting *Brachiaria* spp. (JGMV-Brac) [13]. A distinct JGMV isolate in Brazil infecting *Pennisetum purpureum* was reported previously by our group, and its CP gene was sequenced [5].

Here, we have investigated the biological characteristics of this Brazilian JGMV isolate, hereafter designated as JGMV-CNPGL (Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite strain), and determined its complete genome sequence. Potyvirus-like flexuous and filamentous viral particles were observed in leaves of *P. purpureum*. Leaf

tissues were fixed with 2 % phosphotungstic acid and then examined by transmission electron microscopy (Fig. 1A). The host range and symptomatology of this virus were determined by mechanical inoculation of infected leaf extracts (Fig. 1C) into 14 putative host plants. These plants were kept in greenhouse conditions and monitored for 30 days for the appearance of symptoms. The first symptoms were observed 13 days post-inoculation (dpi), and the infection was confirmed by RT-PCR using specific primers JG8352-F (CAAAGCCCCATACTTGTCGG) and JG9413-R (TTAGCCCCACGGTATGAATG). Ten inoculated plants were susceptible to JGMV-CNPGL, showing two main types of symptoms: chlorotic veins observed in *Zea mays* 2B587, *Zea mays* 3646H1 (Fig. 1B) and *Pennisetum glaucum* (Millet ADR500) and mosaic symptoms in

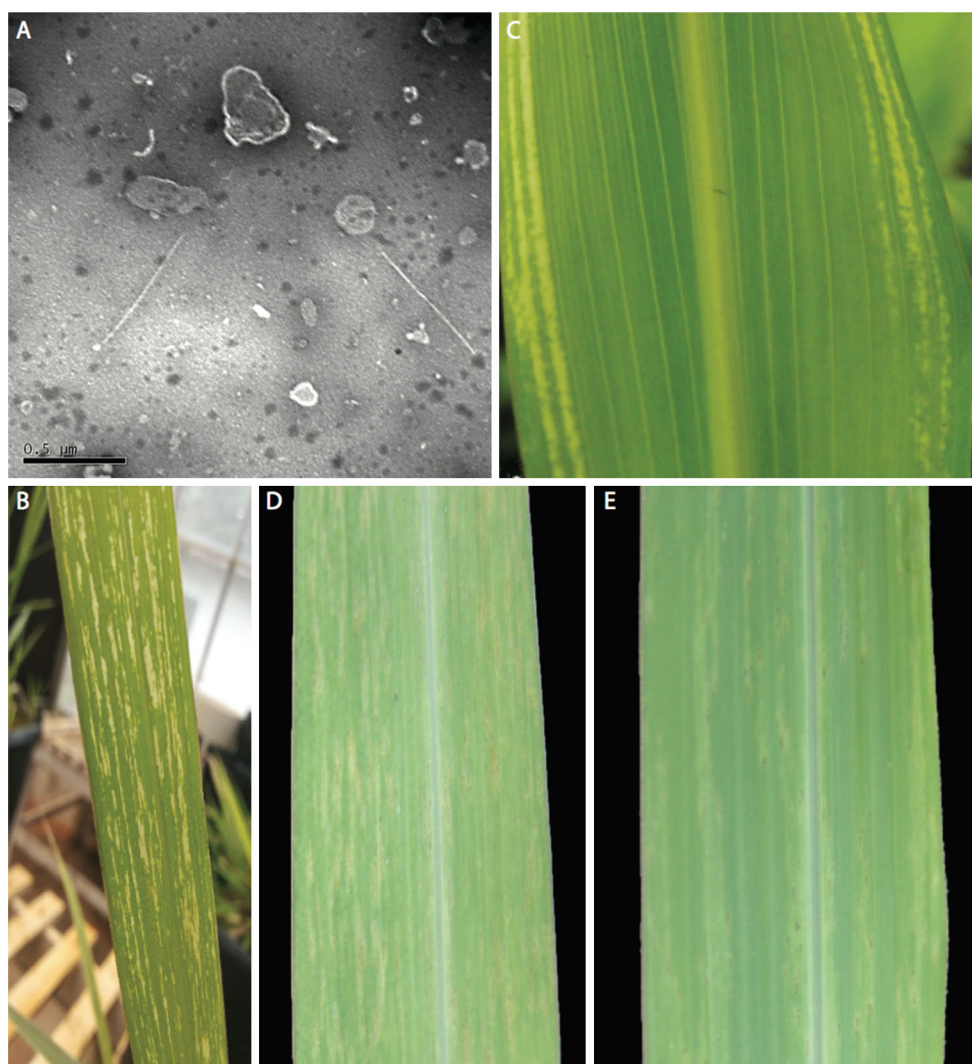


Fig. 1 (A) Virus particles of johnsongrass mosaic virus isolate JGMV-CNPGL (Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite strain) infecting *Pennisetum purpureum*. (B) Symptoms of isolate JGMV-CNPGL in *Zea mays* 3646H1. (C) Symptoms induced by the

JGMV-CNPGL isolate in *Pennisetum purpureum*. (D) Symptoms of isolate JGMV-CNPGL in *Panicum maximum* cv. Mombaça; (E) Symptoms of isolate JGMV-CNPGL in *Sorghum bicolor* BRS332



Fig. 2 Phylogenetic analysis using nucleotide sequences of the polyprotein region of potyviruses. The blue color indicates viruses that infect dicotyledonous plants, and the green color indicates viruses infecting monocots. The complete nucleotide sequence of JGMV-

CNPGL ORF1 was aligned with other potyvirus sequences (Supplementary Table 1) using the translation alignment tool implemented in Geneious 9.1. The phylogenetic tree was inferred using the FastTree algorithm implemented in Geneious 9.1 (color figure online)

Brachiaria brizantha cv. Arapoty, *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, *Panicum maximum* cv. Mombaça (Guineagrass) (Fig. 1D), *Panicum maximum* cv. Massai, *Panicum maximum* C12, BRS Capileto, and *Sorghum bicolor* BRS332 (Fig. 1E). JGMV-CNPGL did not infect *Triticum aestivum* BRS264 (wheat), *Hordeum vulgare* L. VCU-CPAC (barley), *Crotalaria juncea* or *Glycine max* (soybean) under

greenhouse conditions. The JGMV-CNPGL host range was similar to that reported for JGMV-N [14] and JGMV-MDO [15]. More importantly, JGMV-CNPGL infected maize, suggesting that this virus represent a potential threat to this crop in Brazil, one of the largest maize producers.

For genome sequencing of JGMV-CNPGL, viral particles were partially purified as follows. Infected leaves were

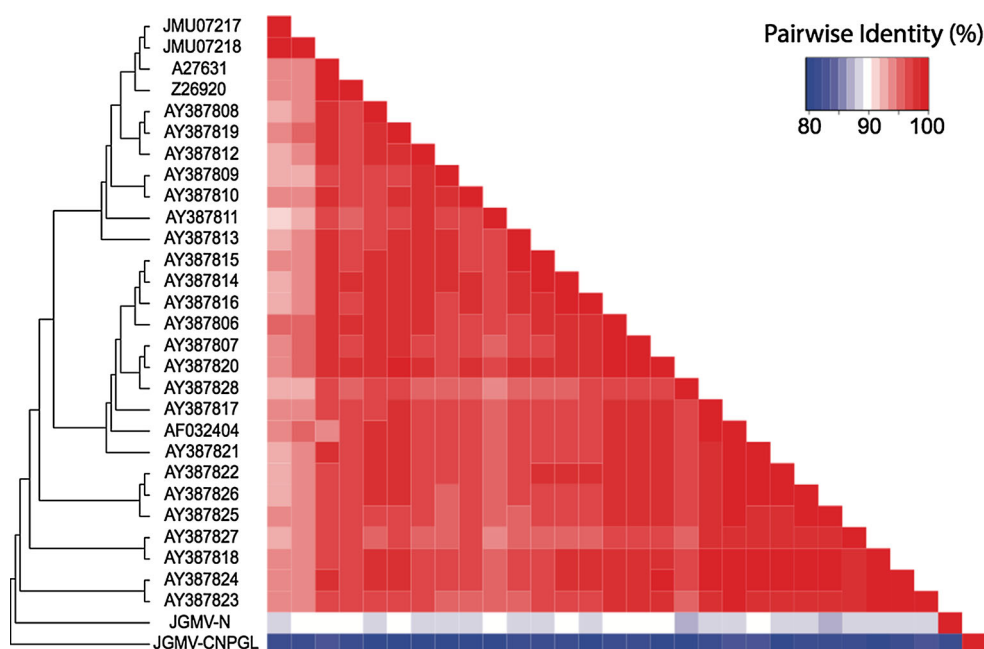


Fig. 3 Pairwise comparison matrix of CP protein sequences from several JGMV isolates. The identity values are presented in the lower triangular matrix, ordered according to the phylogenetic tree. The color represents the identity values (blue to red). The Brazilian isolate (JGMV-CNPGL) was compared to other JGMV sequences from the GenBank database, originating from Australia (A27631, Z26920,

AF032404, AY387806-AY387828), the USA (JMU07217 and JMU07218J) and Nigeria (P83574J). The phylogenetic tree was inferred using the same dataset, and the branches were proportionally transformed using FigTree v. 1.4.2 (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) (color figure online)

first ground in liquid nitrogen, then homogenized in PBS-EDTA and β -mercaptoethanol, and filtered with cheesecloth. The filtrate was then centrifuged through a sucrose cushion at $33,000 \times g$ for 2 h, and the pellet was resuspended in PBS. From this enriched virus fraction, total RNA was extracted using an RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA), following the manufacturer's manual. RNA samples were sequenced at Catholic University of Brasilia (UCB) using a Nextera DNA Library Preparation Kit and an Illumina MiSeq platform. The paired-ends reads (7,402,180) were quality-filtered, the adapter sequences were removed, and contigs were assembled *de novo* using CLC Genomics Workbench version 6.0.3. The assembled contigs were compared using blastx against the Viral RefSeq database, and contigs related to JGMV were selected and mapped to the reference genome of JGMV (NC-003606). The complete genome sequence was 9,865 nucleotides (nt) long with two open reading frames (ORFs), and 28,967 reads aligned back to it. ORF1, which encompasses 9,414 nt, encodes a large polyprotein consisting of 3,059 amino acids (aa). After proteolytic cleavage, the proteins P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-pro, NIb and CP are predicted. ORF2 (2,793-3,068 nt), embedded in the P3 cistron, encodes the P3N+PIPO protein (91aa), which was identified by the presence of the conserved motif G₁A₆. Several

motifs previously reported to be conserved among potyviruses have been found, including HXDXSG and FIIRGR in P1 [17], GDD in NIb, Y/FK/RNK in HC-Pro [18] and DAG in the CP. However, the KITC motif of HC-Pro, which is involved in the interaction of the viral particle and the stylus [19], is absent in the JGMV-CNPGL isolate. The lack of this conserved motif has been reported for other potyviruses such as soybean mosaic virus [20] and wisteria vein mosaic virus [21]. The 5' and 3' untranslated regions (UTR) were 237 nt and 451 nt long, respectively, and both were confirmed by RACE. The JGMV-CNPGL genome was deposited under GenBank accession number KT833782.

The complete nucleotide sequence of JGMV-CNPGL ORF1 was aligned with other potyvirus sequences (Supplementary Table 1) using the translation alignment tool implemented in Geneious 7.1 [22]. As shown in Fig. 2, JGMV isolates clustered with canna yellow streak virus. All the viruses grouped in this clade infect only monocots, suggesting an ancestral adaptation towards these hosts. A comparison of the JGMV-CNPGL genome sequence with those of other potyviruses revealed highest nucleotide sequence identity (80 % nt and 86 % aa) to a JGMV isolate from Australia (NC-003606). The nucleotide sequence identity between these viruses was 70 % for P1, 76 % for HC-Pro, 85 % for P3, 86 % for 6K1, 83 % for CI, 83 % for

6K2, 81 % for VPg, 84 % for NIa-pro, 85 % for NIb, 78 % for CP, 41 % for 5'UTR and 85 % for 3'UTR. Figure 3 presents the full comparison matrix sequence and phylogenetic analysis based on CP aa sequences of JGMV-CNPGL and other JGMV isolates from three different countries (Australia, United States and Nigeria).

To establish a new potyvirus species, its members must share CP identity values lower than 76–77 % nt and 80 % aa. The identity between the CP of JGMV-CNPGL and JGMV Australian isolate was 78 % nt and 82 % aa, respectively, slightly above the threshold for new species demarcation [23]. Although these two isolates belong to the same species, the N-terminal region of CP from JGMV-CNPGL is highly divergent in the region from aa residues 9 to 85, showing only 38 % identity in this region. Interestingly, another JGMV isolate infecting *Panicum maximum* was recently reported in Brazil (GenBank accession number 289893). Although this isolate shares 80 % sequence identity with JGMV Australia, it cannot infect *P. purpureum* and maize, unlike JGMV-CNPGL. These observations indicate that these differences among JGMV isolates lead to biological variations regarding host range, for instance. The implications of this amino-terminal variation in JGMV-CNPGL remain to be investigated. Considering that *P. purpureum* and *P. maximum* originated in Africa, it is reasonable to assume that JGMV also emerged in the same area. More-intense sampling efforts may help to understand its evolutionary history and adaptations to distinct hosts.

Acknowledgments We want to acknowledge Dr. Francisco José da Silva Ledo for providing the infected *Pennisetum purpureum* plants, and Dr. Francisco Duarte Fernandes and Ivanilson Luis Lopes da Silva for providing the seeds for experimental inoculation. This work was financially supported by the National Council for Science and Technology (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Foundation for Research Support of the Distrito Federal (FAP-DF) and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa).

Compliance with ethical standards

This work was financially supported by the National Council for Science and Technology (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Foundation for Research Support of the Distrito Federal (FAP-DF) and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). All authors declare they have no conflict of interest. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Araújo SAC, Deminicis BB, Campos PRS (2008) Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras Tropicais no Brasil. Arch Zootec 57:61–76
- Bennet HW (1976) Pasto Johnson, pasto alfombra y otras graminéas para el sur humedo de los Estados Unidos. In: Hugues HD, Heath ME, Metcalfe DS (eds) Forrajes, México, C.E.C.S.A., pp 321–334
- Wayne WH, Warren GM (1980) Yield, quality, and breeding behavior of Pearl Millet X Napiergrass interspecific hybrids. Agron J 72:358–360
- Yasuda M, Ishii Y, Ohta K (2014) Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schumacher) as raw material for bioethanol production: pretreatment, saccharification, and fermentation. Biotechnol Bioprocess Eng 19:943–950
- Silva KN, Nicolini C, Silva MS, Fernandes CD, Nagata T, Resende RO (2013) First report of Johnsongrass mosaic virus (JGMV) infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil. Plant Dis 97:1003
- McDaniel LL, Gordon DT (1989) Characterization of the oat-infecting strain of maize dwarf mosaic virus. Phytopathology 79:113–120
- Teakle DS, Grylls NE (1973) Four strains of sugarcane mosaic virus infecting cereals and other grasses in Australia. Aust J Agric Res 24:465–477
- Shukla DD, Gough KH, Ward CW (1987) Coat protein of potyviruses: comparison of amino acid sequences of the coat proteins of four Australian strains of sugarcane mosaic virus. Arch Virol 96:59–74
- Taylor RH, Pares RD (1968) The relationship between sugarcane mosaic virus and mosaic virus maize and Johnson grass in Australia. Aust J Agric Res 19:767
- Gough KH, Shukla DD (1993) Nucleotide sequence of Johnsongrass mosaic Potyvirus genomic RNA. Intervirology 36:181–192
- Karan M, Noone DF, Teakle DS, Hacker JB (1992) Susceptibility of pearl millet accessions and cultivars to Johnsongrass mosaic and sugarcane mosaic viruses in Queensland. Aust Plant Pathol 21:128–130
- Mariño AA, Garrido MJ, Ascanio A (2009) Reacción de cultivos de maíz al Potyvirus del mosaic del pasto Johnson. Fitopatología Venezuela. 22:35–36
- Morales FJ, Ospina MD, Castaño M, Calvert LA (1996) Sequence analysis of the genomic RNA 3-terminal region of a potyvirus from *Brachiaria* spp. related to *Guineagrass mosaic virus*. J Phytopathol 144:485–489
- Seifers DL, Haber S, Ens W, She YMK, Standing G, Salomon R (2005) Characterization of a distinct Johnsongrass mosaic virus strain isolated from sorghum in Nigeria. Arch Virol. 150:557–576
- Shukla DD, Ward CW (1989) Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Arch Virol 106:171–200
- Garrido MJ, Trujillo GE (1993) Occurrence of Johnsongrass mosaic virus on sorghum in Venezuela. Plant Dis 77:847
- Verchot J, Herndon KL, Carrington JC (1992) Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. Virology 190:298–306
- Shiboleth YM, Haronsky E, Leibman D, Arazi Tzahi, Wassenecker M, Whitham SA, Gaba V, Amit Gal-On A (2007) The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. J Virol 81:13135–13148
- Blanc S, Ammar ED, Garcia-Lampasona S, Dolja VV, Llave C, Baker J, Pirone TP (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interaction with virions and aphid stylets. J Gen Virol 79:3119–3122
- Jayaram Ch, Hill JH, Miller AW (1992) Complete nucleotide sequences of two soybean mosaic virus strains differentiated by

- response of soybean containing the Rsv resistance gene. *J Gen Virol* 73:2067–2077
21. Liang WX, Song LM, Tian GZ, Li HF, Fan ZF (2006) The genomic sequence of Wisteria vein mosaic virus and its similarities with other potyviruses. *Arch Virol* 151(11):2311–2319
 22. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinf Appl Note* 28:647–1649
 23. Adams MJ, Antoniw JF, Fauquet CM (2005) Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch Virol* 150:459–479



Microbiology Society - License Terms and Conditions

Order Date	02-Jan-2020
Order license ID	1011448-1
ISSN	1465-2099
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Publisher	Microbiology Society
Portion	Chart/graph/table/figure

LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of general virology	Publication Type	e-Journal
Article Title	Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection	Start Page	1415
		End Page	1429
Author/Editor	Society for General Microbiology	Issue	Pt_7
		Volume	95
Date	01/01/1998	URL	http://www.sgm.ac.uk/JGV/
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		
Rightsholder	Microbiology Society		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chart/graph/table/figure	Distribution	Worldwide
Number of charts / graphs / tables / figures requested	1	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Current edition and up to 10 years	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Estudos biológicos e moleculares dos patossistemas Johnsongrass mosaic virus (JGMV) e Maize chlorotic dwarf virus (MCDV) em gramíneas forrageiras	Institution name	UNB- University Brazilian
		Expected presentation date	2020-01-02
Instructor name	Renato de oliveira Resende		

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Karina Nascimento da Silva Fragoso
------------------------	-----	---	------------------------------------

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	1	Title of the article/chapter the portion is from	Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection
Editor of portion(s)	Ivanov, K. I.; Eskelin, K.; Löhmus, A.; Mäkinen, K.	Author of portion(s)	Ivanov, K. I.; Eskelin, K.; Löhmus, A.; Mäkinen, K.
Volume of serial or monograph	95	Issue, if republishing an article from a serial	Pt_7
Page or page range of portion	1415-1429	Publication date of portion	2014-07-01

CCC Republication Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
 - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
 - 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.
 - 3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by

deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).

- 3.4. In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.
- 3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.
- 3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.
4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.
5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.
6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.
7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of

less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

8. Miscellaneous.

- 8.1. User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.
- 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here: <https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
- 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
- 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
- 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to support@copyright.com.

v 1.1