



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

**CATERYNNE MELO KAUFFMANN**

**PRODUÇÃO DE ANTISSOROS POLICLONAIS A PARTIR DE EXPRESSÃO  
TRANSIENTE DO GENE DO NUCLEOCAPSÍDEO DE watermelon crinkle leaf-associated  
virus 1 e 2**

**BRASÍLIA – DF**

**2021**

**CATERYNNE MELO KAUFFMANN**

**Produção de antissoros policlonais a partir de expressão transiente do gene do nucleocapsídeo  
de watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2**

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

**Orientador:**

**Dr. Tatsuya Nagata**

**BRASÍLIA**

**DISTRITO FEDERAL- BRASIL**

**2021**

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço à Deus por guiar e iluminar meus caminhos, possibilitando ter pessoas boas em minha vida.

Aos meus pais, que sinto tanta falta, Ana Paula e Edson Kauffmann, agradeço imensamente por todo o apoio, amor, momentos bons e acolhimento sempre.

A minha família, avós, tias(os), primas(os), afilhada (o), pela companhia, pelo barulho, pelos lanches e café no final da tarde, aniversários, risadas e abraços.

Ao meu orientador, Tatsuya Nagata, que tanto admiro pelo acolhimento, apoio para minhas decisões, paciência para ensinar, disponibilidade de discutir ideias e hipóteses, incentivo de nunca me deixar desanimar, amar a ciência e café.

Aos os meus colegas de laboratório (Ikaro Alves, Macária Duarte, Marina Vendramini, Pedro Hamann, Luísa Valerio, Matheus Maeda, Lucas Koyama) pelo auxílio em experimentos, por ouvir meus conselhos, minhas lamentações, estresses e piadas, sempre solícitos e disponíveis para ajudar, principalmente para hora do meu café.

A todos meus amigos pelo afeto, apoio e presença. De modo especial, a Andreza Martins e o Saulo Chaves que são amigos para vida. Amanda Botelho por me ouvir contar como foi minha semana, compartilhar almoços e ser companheira nessa cidade.

A Alessandra Boari pelo incentivo e ter aberto os caminhos da ciência na minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha trajetória acadêmica e pessoal.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gráfico apresenta os principais Estados produtores de melancia do Brasil (em toneladas).  
..... 17
- Figura 2:** Folhas de melancieira com sintomas de mosaico, bolhosidade e amarelecimento de nervura (A-C), epinastia, bolhosidade, desvio de cor e deformação foliar (B), sintomas causados por infecção mista de isolados de watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2 e groundnut ringspot orthotospovirus em Juazeiro-BA, 2019. .... 20
- Figura 3:** Representação da organização genômica e estratégia de expressão de genes de WCLaV-1 e -2. RdRp: polimerase de RNA dependente de RNA; MP: proteína de movimento putativo; NP: proteína do nucleocapsídeo. .... 21
- Figura 4:** Região do T-DNA das construções após clonagem dos insertos de WCLaV-1 e -2 e vetor viral PepRSV. RNA-2 (M3B) em vetor binário pJL89. 35S, promotor do cauliflower mosaic virus; 5' UTR do RNA-2 de PepRSV, inserto do gene do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 com HisTag, 3' UTR do RNA-2 de PepRSV, Rz: ribozima do hepatitis delta virus; TNos: terminador NOS. .... 26
- Figura 5:** Infiltração a vácuo de *Nicotiana benthamiana* em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* com construções de WCLaV -1 e -2. .... 29
- Figura 6:** Árvore filogenética composta por sequência de nucleotídeos do nucleocapsídeo de espécies do gênero *Coguvirus* com seus respectivos números de acesso. Valores de bootstrap (500 repetições) e o número de acesso de cada sequência é indicado. .... 34
- Figura 7:** Coloração de prata para avaliação de diferentes concentrações de imidazol para eluição das proteínas do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 expressadas em plantas de *Nicotiana benthamiana*. O tamanho esperado das proteínas purificadas de WCLaV-1 e -2 é de aproximadamente 40 kDa. M: marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). .... 35
- Figura 8:** Western blotting (A) e coloração de prata de SDS-PAGE (B) com proteínas recombinantes do nucleocapsídeo purificada e parcial purificada de WCLaV-1 e WCLaV-2, respectivamente. O tamanho da proteína purificada é de aproximadamente 40 kDa. M: marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). .... 36
- Figura 9:** Dot-ELISA para observação da reatividade e sensibilidade dos antissoros policlonais produzidos (antissoro WCLaV-1; antissoro WCLaV-2) para WCLaV-1(NC-1) e WCLaV-2 (NC-2). As amostras são as proteínas do nucleocapsídeo expressadas e purificadas de WCLaV-1 e -2 em diferentes concentrações (1 µg; 0,1 µg; 0,01 µg; 0,001 µg). .... 37
- Figura 10:** (A) Alinhamentos de proteínas da NC de WCLaV-1 e -2; epítomos previstos pelo programa Ellipro podem ser observados em azul. (B) Alinhamento de estruturas 3D das regiões de alta

probabilidade por Phyre2 de WCLaV-1 (em amarelo) e -2 (em vermelho). Estrutura desta região é altamente conservada mesmo com a identidade de aminoácidos baixa (59% de identidade). .....37

**Figura 11:** Dot-ELISA para avaliar reatividade de antissoros policlonais produzidos para WCLaV-1 e -2 com amostras de plantas infectadas. Amostras de folha de melanciaira que foram inoculadas mecanicamente a partir de isolados de campo (1-6); controle positivo de vírus semi-purificado (C+); controle negativo (C-). ..... 38

**Figura 12:** Gel de eletroforese dos produtos obtidos a partir de RT-PCR para detecção de GRSV, WCLaV-1 e -2. Amostras inoculadas mecanicamente com isolados de campo com infecção mista de GRSV, WCLaV-1 e -2 (1-6) e controle positivo (7). M: marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). ..... 39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Ranking dos principais países produtores de melancia (toneladas). .....	16
<b>Tabela 2:</b> Produção em toneladas de melancia no Brasil por grandes regiões.....	16
<b>Tabela 3:</b> Comparação de interpretação de resultados obtidos por Dot-ELISA e RT-PCR .....	39

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b>	7
<b>RESUMO GERAL</b>	9
<b>GENERAL ABSTRACT</b>	11
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	13
<b>JUSTIFICATIVA</b>	14
<b>OBJETIVO GERAL</b>	15
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b>	15
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
<b>1.1 A cultura da melancia no Brasil</b>	15
<b>1.2 Principais vírus de melancia no país</b>	17
<b>1.3 Família <i>Phenuiviridae</i></b>	18
<b>1.4 Gênero <i>Coguvirus</i></b>	19
<b>1.5 Watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2</b>	19
<b>1.6 Sorologia aplicada à virologia vegetal</b>	21
<b>1.7 Expressão heteróloga de genes em plantas</b>	22
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	23
<b>2.1 Obtenção das amostras de melancia</b>	23
<b>2.2 Detecção de WCLaV-1, WCLaV-2 e GRSV por RT-PCR em amostras de campo, sequenciamento Sanger e análise filogenética</b>	23
<b>2.3 Preparação cDNA do inserto de WCLaV-1 e -2 usando transcrição reversa (RT) e amplificação por PCR para clonagem</b>	24
<b>2.4 Preparação do vetor viral para clonagem</b>	25
<b>2.5 Produção de DNA recombinante utilizando Gibson Assembly e agroinfiltração</b>	25
<b>2.6 Sequenciamento Sanger para validação das construções de NC WCLaV-1-RNA2 e NC WCLaV-2-RNA2</b>	26
<b>2.7 <i>Western blotting</i> para confirmação da expressão heteróloga da proteína do nucleocapsídeo de WCLaV -1 e -2 em plantas</b>	27
<b>2.8 Agroinfiltração a vácuo de <i>Nicotiana benthamiana</i> com as construções de NC WCLaV-1-RNA2 e NC WCLaV-2-RNA2</b>	28
<b>2.9 Purificação de proteína do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2</b>	29
<b>2.10 Quantificação de proteína</b>	29

<b>2.11 <i>Western blotting</i> e coloração de prata das proteínas purificadas do nucleocapsídeo de WCLaV -1 e -2 para verificação da qualidade</b>	30
<b>2.12 Produção de antissoro policlonal de WCLaV-1 e -2</b>	30
<b>2.13 Inoculação mecânica dos isolados de WCLaV-1 e -2</b>	31
<b>2.14 Dot-ELISA para avaliar eficiência e sensibilidade de antissoros brutos</b>	32
<b>2.15 RT-PCR para detecção de GRSV, WCLaV-1 e -2 em amostras testadas por Dot-ELISA</b>	32
<b>2.16 Predição de epítopos semelhantes para WCLaV-1 e -2</b>	33
<b>3. RESULTADOS</b>	33
<b>3.1 Análise filogenética dos isolados de WCLaV-1 e -2 obtidas de amostras de campo</b>	33
<b>3.2 Purificação e qualidade das proteínas recombinantes do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 obtidas</b>	34
<b>3.4 Reatividade e sensibilidade de antissoros policlonais de WCLaV-1 e -2 em proteína expressa purificada e visualização de previsão de epítopos semelhantes entre WCLaV-1 e -2</b>	36
<b>3.5 Reatividade dos antissoros policlonais de WCLaV-1 e -2 utilizando plantas infectadas</b>	38
<b>3.6 RT-PCR de amostras testadas por Dot-ELISA</b>	38
<b>4. DISCUSSÃO</b>	40
<b>5. CONCLUSÕES</b>	44
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	45



## RESUMO GERAL

KAUFFMANN, Caterynne Melo. **Produção de antissoros policlonais a partir de expressão transiente do gene do nucleocapsídeo de watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2.** 2021. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] é um fruto de importância econômica em todo o mundo, sendo muito cultivado dentro das cucurbitáceas (Santos *et al.*, 2011). Recentemente, o watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2 (WCLaV-1 e -2) foram relatados na China (Xin *et al.*, 2017) e nos Estados Unidos (Hernandez *et al.*, 2021), ocasionando sintomas de mosaico amarelo e deformação foliar em campos de produção. No Nordeste brasileiro, nos Estados do Ceará, Bahia e Piauí foi relatada a presença do WCLaV-1 e/ou -2, causando os mesmos tipos de sintomas (Maeda *et al.*, 2021). Assim, o objetivo desse trabalho foi a produção de antissoros policlonais de WCLaV-1 e -2 presentes no Brasil, a partir de expressão transiente de proteína em plantas, para fins de detecção. Os fragmentos de cDNA do nucleocapsídeo (NC) de ambos os isolados virais foram clonados na construção de cDNA de RNA-2 do vetor viral pepper ringspot virus (PepRSV) (Tavares-Esashika *et al.*, 2020) utilizando reações de Gibson Assembly. Os clones foram transfectados em *Escherichia coli* cepa DH10B por eletroporação (Blawid & Nagata, 2015). Após a confirmação das sequências por método Sanger, *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101:pMP90 foi transformada com as construções. Plantas de *Nicotiana benthamiana* foram agroinfiltradas com as construções do RNA-2 modificadas junto com RNA-1, e quatro dias depois, as proteínas recombinantes do NC das duas espécies virais foram analisadas por *Western blotting*, utilizando anticorpo para HisTag, pois as proteínas recombinantes possuem cauda de hexahistidina nos terminais-C. Realizou-se purificação da proteína do NC do WCLaV-1 e -2 de acordo com protocolo estabelecido pelo laboratório de Virologia Geral da UnB utilizando a resina de Ni-NTA. Os antígenos purificados foram injetados em coelho, separadamente, por injeção com intervalo de 3 semanas, total de 3 injeções. A primeira injeção, o antígeno foi emulsificado com adjuvante Freund's completo e as outras duas com adjuvante Freund's incompleto. Os antissoros policlonais produzidos reagiram com proteínas expressadas e vírus semi-purificados, de 10 plantas infectadas de melancieiras com sintomas virais fortes coletados em Juazeiro, Bahia em 2019, por Dot-ELISA. O antissoro do WCLaV-1 reagiu mais especificamente com o WCLaV-1, mas não com o WCLaV-2. Entretanto, apesar do antissoro do WCLaV-2 reagir fortemente com o antígeno alvo, o antissoro apresentou fraca reação com WCLaV-1. Estes anticorpos

foram testados utilizando amostras de melancia estocadas no freezer -70 °C e inoculados mecanicamente, e reagiram em nível médio. As infecções foram confirmadas por RT-PCR e os resultados foram coerentes comparando-os por Dot-ELISA.

**Palavras-chave:** Cucurbitáceas, Coguvirus, antissoros policlonais.

## GENERAL ABSTRACT

KAUFFMANN, Caterynne Melo. **Production of polyclonal antisera from the transient expression of the nucleocapsid gene of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and 2 2021.** 49 p. Dissertation (Master in Plant Pathology) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] is a fruit of economic importance throughout the world, being widely cultivated within cucurbits (Santos *et al.*, 2011). Recently, watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and 2 (WCLaV-1 and -2) have been reported in China (Xin *et al.*, 2017) and the United States (Hernandez *et al.*, 2021), causing yellow mosaic symptoms and leaf deformation in production fields. In Northeastern Brazil in the states of Ceará, Bahia, and Piauí, the presence of WCLaV-1 and/or -2 has been reported, causing the same type of symptoms (Maeda *et al.*, 2021). Thus, the objective of this work was the production of polyclonal antisera of WCLaV -1 and -2 present in Brazil, from a transient expression of a protein in plants, for detection purposes. Nucleocapsid (NC) cDNA fragments from both viral isolates were cloned into the RNA-2 cDNA construct of the pepper ringspot virus (PepRSV) viral vector (Tavares-Esashika *et al.*, 2020) using Gibson Assembly reactions. Clones were transfected into *Escherichia coli* strain DH10B by electroporation (Blawid & Nagata, 2015). After sequence confirmation by the Sanger method, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101:pMP90 was transformed with the constructs. *Nicotiana benthamiana* plants were agroinfiltrated with the RNA-2 constructs modified together with RNA-1, and four days later, the recombinant NC proteins of the two viral species were analyzed by Western blotting using the antibody to HisTag, as the recombinant proteins have a hexahistidine-tag at the C-terminal. Purification of NC protein from WCLaV-1 and -2 was carried out according to the protocol established by the General Virology Laboratory of UnB using Ni-NTA resin. The purified antigens were injected into a rabbit, separately, by injection at an interval of 3 weeks, totaling 3 injections. In the first injection, the antigen was emulsified with complete Freund's adjuvant and the other two with incomplete Freund's adjuvant. The polyclonal antisera produced reacted with expressed proteins and semi-purified viruses from 10 infected watermelon plants with strong viral symptoms collected in Juazeiro, Bahia in 2019 by Dot-ELISA. The antiserum from WCLaV-1 reacted more specifically with WCLaV-1 but not WCLaV-2. However, despite the antiserum of WCLaV-2 reacting strongly with the target antigen, the antiserum showed a weak reaction with WCLaV-1. These antibodies were tested using watermelon samples stored in a freezer at -70 °C and mechanically inoculated, and reacted at a

medium level. Infections were confirmed by RT-PCR and results were coherently comparing them by Dot-ELISA.

Keywords: Cucurbits; Coguvirus; polyclonal antiserum

## INTRODUÇÃO GERAL

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] é um fruto de importância econômica em todo o mundo, sendo uma das culturas mais cultivadas dentro das cucurbitáceas (Santos *et al.*, 2011). Pode ser consumida de várias formas como: sucos, sorvetes, geleias, molhos e doces, mas o consumo principal é na forma *in natura* (Sousa *et al.*, 2019).

O continente asiático é o principal produtor com 81,5% da produção mundial, seguido dos continentes americano e africano com 6,5% e 6,1% de produção, respectivamente (FAOSTAT, 2019). O Brasil é o 4º principal produtor do mundo, sendo a região nordeste a maior produtora com produção de 775.324 toneladas em 2019, seguida das regiões Sul (456.831 t) e o Centro-Oeste (425.789 t) (IBGE, 2019).

As cucurbitáceas, em geral, sofrem perdas de produtividade devido a doenças causadas por vírus. Dentre os agentes etiológicos podem ser destacados: o papaya ringspot virus – type watermelon (PRSV-W), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) e o watermelon mosaic virus (WMV), que pertencem ao gênero *Potyvirus*; o cucumber mosaic virus (CMV), gênero *Cucumovirus*, o squash mosaic virus (SqMV), gênero *Comovirus*; o zucchini lethal chlorosis orthospovirus (ZLCV), gênero *Orthospovirus* (Kitajima, 2020).

Recentemente, a melancieira tornou-se uma nova hospedeira natural de três espécies virais relatadas no Brasil nos últimos seis anos; o groundnut ringspot orthospovirus (GRSV), gênero *Orthospovirus* em São Paulo (Leão *et al.*, 2015) e watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2 (WCLaV-1 e -2) na Bahia e Rio Grande do Norte, família *Phenuiviridae* (Maeda *et al.*, 2021). Os vírus mencionados apresentam sintomas de mosaico e deformação foliar, sendo os três relatados em infecção mista somente em campos de produção da região Nordeste do Brasil (Maeda *et al.*, 2021).

Para uma correta identificação e monitoramento da distribuição de agentes etiológicos em campo é importante uma diagnose acurada, para isso métodos sorológicos, biológicos e moleculares são utilizados, tornando-se essenciais para aplicação de medidas de controle eficientes (Lima, 2009). A sorologia é uma técnica importante na identificação de vírus vegetais, sendo menos onerosa e mais utilizada para diagnósticos de grande quantidade de amostras vegetais (Almeida, 1995; Ling *et al.*, 2000; Agrios, 2004).

Para aplicação de métodos sorológicos é necessário produzir anticorpos específicos para vírus, os antígenos produzidos a partir de vírus purificado são imunizados em animais como coelhos, em geral (Almeida, 1995). Entretanto, a preparação de vírus purificados não é sempre viável devido a infecção mista, baixa concentração de vírus e dificuldade de preparar plantas infectadas em condição

uniforme (Colariccio et al, 2000; Hull, 2013). Nestas ocasiões, a preparação de antígeno viral é feita por sistemas de expressão heteróloga de genes. As proteínas virais estruturais ou não estruturais expressas em *Escherichia coli*, podem ser utilizadas para produção de antissoros policlonais para diagnóstico sorológico (Fajardo et al., 2007). No entanto, o uso de *E. coli* como sistema de expressão apresenta algumas desvantagens, como a incapacidade da bactéria em realizar modificações pós-traducionais, como a glicosilação, a produção de proteínas inativas e geração de corpos de inclusão (Sahdev et al., 2007). Com isso, antissoros feitos com antígenos preparados de *E. coli* tendem a apresentar baixa qualidade e reatividade, e em geral, não é viável para ser utilizados em diagnóstico de rotina de sorologia.

O sistema de vetor viral vegetal baseado no vírus pepper ringspot virus (PepRSV), gênero *Tobravirus* para expressar genes recombinantes foi desenvolvido no nosso laboratório recentemente (Tavares-Esashika et al., 2020). Essa técnica inclui o uso de Gibson Assembly (GA), que não utiliza enzimas de restrição, é realizada em poucos passos, sendo o produto final sem cortes ou lacunas e de bom rendimento (Blawid & Nagata, 2015).

O objetivo desse trabalho é produzir antissoros policlonais de WCLaV-1 e -2 presentes no Brasil. No entanto, a preparação de vírus purificado como antígeno não foi viável devido infecção mista entre GRSV, WCLaV-1 e -2, e a dificuldade de inocular mecanicamente em melancia. Diante disso, os genes do nucleocapsídeo (NC), o principal antígeno dos vírus, foram expressos em plantas de *Nicotiana benthamiana* utilizando vetor viral de PepRSV e estas proteínas foram utilizados para imunizar coelhos. Desse modo, antissoros policlonais de WCLaV-1 e -2 foram produzidos para fins de detecção.

## **JUSTIFICATIVA**

Considerando que WCLaV-1 e -2 são vírus novos no Brasil e estão presentes em plantios de melancia na região Nordeste, principal produtora, é importante produzir ferramentas que possibilitem a identificação e monitoramento desses agentes etiológicos em outros campos de produção de melancia. Com isso, faz-se necessário uso de antissoros policlonais, já que a sorologia é o método menos oneroso, específico e possibilita detecção do agente etiológico em muitas amostras ao mesmo tempo quando comparada com outros métodos existentes.

## OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo produzir antissoros policlonais de watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2 utilizando antígenos preparados por expressão heteróloga do nucleocapsídeo em plantas.

## OBJETIVO ESPECÍFICO

- Expressar o gene do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 em plantas de *Nicotiana benthamiana* a partir da expressão transiente utilizando vetor viral de PepRSV;
- Produzir antissoro policlonal em coelho para nucleocapsídeos de WCLaV-1 e -2.
- Avaliar a reatividade de antissoros policlonais utilizando proteínas expressadas purificadas do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 e plantas infectadas por WCLaV-1 e -2.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 A cultura da melancia no Brasil

A melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai,] família Cucurbitaceae], tem como origem as regiões tropicais da África Equatorial, é uma das olerícolas mais importantes no país. É uma cultura que apresenta retorno financeiro rápido, pois apresenta ciclo curto (3 a 4 meses) e o manejo é mais simples quando comparada com outras hortícolas (Boari *et al.*, 2017). Algumas das características incluem crescimento estolonífero, podendo alcançar até 5 metros de ramas; possuem gavinhas, que são estruturas importantes para fixação; sistema radicular superficial, ocupando até 30 centímetros de profundidade e apresentam flores monoicas (Lambert *et al.*, 2017).

Os três principais países produtores de melancia são do continente asiático: a China, a Turquia e o Irã, somando 81,5% da produção mundial, enquanto o Brasil ocupa a 4<sup>o</sup> posição no *ranking* dos maiores produtores de melancia (Tabela. 1; FAOSTAT, 2019). As regiões Nordeste e Sul são as principais produtoras no Brasil com mais de 775 mil e 456 mil toneladas produzidas em 2019, respectivamente (IGBE, 2019). Na região Nordeste, o Estado do Rio Grande do Norte é o maior produtor com 351.997 toneladas, o Estado do Rio Grande do Sul é segundo maior produtor com 318.194 toneladas, seguido de São Paulo (260.645 t) e Goiás (254.215 t) (Tabela. 2; Fig. 1; IGBE, 2019).

As principais cultivares de melancia comercializadas são classificadas em diferentes grupos: (Crimson Sweet, Charleston Gray, Jubilee, Omaro Yamato, Mini Melancias, Melancia sem

Sementes). Esses grupos são diferenciados quanto ao tipo, resistência a doenças e grau Brix (Lima, 2014). O grupo Crimson Sweet é o que apresenta maior número de cultivares disponíveis, no mercado brasileiro é o grupo preferido por possuir boas características para cultivo, transporte e consumo (Lima, 2014). Os frutos do tipo Crimson Sweet são arredondados, peso de cerca de 10 kg, a casca é clara com estrias verde-escuro e polpa de coloração vermelha intensa. Quando submetida a irrigação elevada os frutos tendem a apresentar melhores características agrônômicas, como frutos padronizados e alto grau Brix (Chaves *et al.*, 2013).

**Tabela 1:** Ranking dos principais países produtores de melancia (toneladas).

<b>Posição</b>	<b>Países</b>	<b>Produção (toneladas)</b>
1	China	79.244.271
2	Turquia	3.928.892
3	Irã	3.813.850
4	Brasil	2.090.432
5	Uzbequistão	1.976.373
6	Argélia	1.877.069
7	Estados Unidos	1.823.160
8	Rússia	1.757.972
9	Egito	1.680.994
10	México	1.199.648

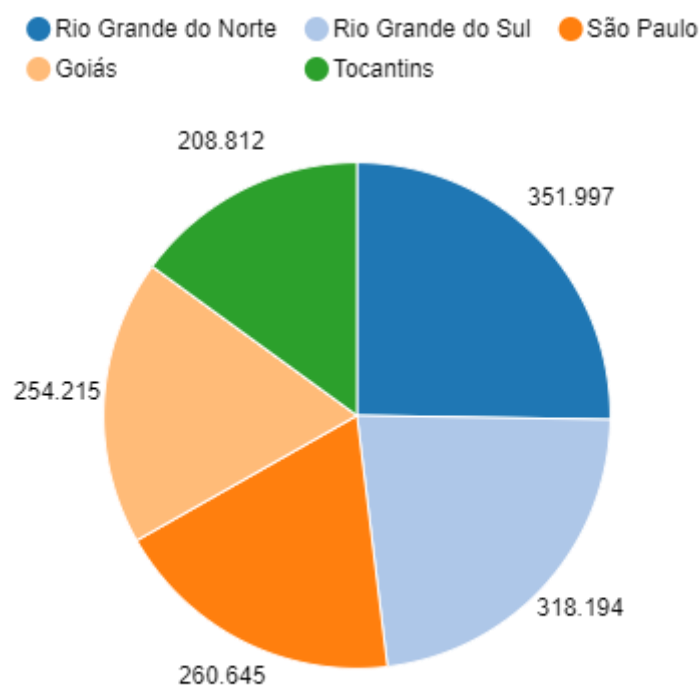
Fonte: FAOSTAT (2019)

**Tabela 2:** Produção em toneladas de melancia no Brasil por grandes regiões.

<b>Regiões do Brasil</b>	<b>Produção (toneladas)</b>
Nordeste	775.324
Sul	456.831
Norte	425.789
Centro-Oeste	318.239
Sudeste	302.003
<b>Total:</b>	<b>2.278.186</b>

Fonte: IBGE- Produção Agrícola Municipal (2019)





Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal

**Figura 1.** Gráfico apresenta os principais Estados produtores de melancia do Brasil (em toneladas).  
**Fonte:** IBGE - Produção Agrícola Municipal (2019).

A melancieira é acometida por diversos patógenos como: nematoides, fungos, bactérias e vírus. Dentre eles os vírus se destacam como importantes para a cultura, pois limitam a produção (Lima, 2014). As cucurbitáceas apresentam infecções mistas de alguns vírus, quando sinérgicos são mais severos, aumentando o grau de virulência dentro de uma população de plantas (Ramos *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2015).

Nesta dissertação será destacado somente viroses de melancieira, visto que, os vírus são os patógenos alvo deste estudo.

## 1.2 Principais vírus de melancia no país

As doenças causadas por vírus são destaque para as cucurbitáceas, principalmente para melancieira. Em geral, ocorrem com grande incidência e diferentes níveis de severidade, causando prejuízo com redução da produção e produtividade (Lima, 2014). As perdas são variáveis, pois dependem da cultivar implantada, isolados virais presentes na área e das condições edafoclimáticas.

Os principais sintomas de infecção viral em melancia são: mosaico, bolhosidade, epinastia, necrose, clorose e deformação na casca do fruto. Quando ocorrem infecções mistas os sintomas podem

ser graves, como distorção de folhas e protuberâncias graves nos galhos da planta (Aguiar *et al.*, 2015).

Alguns vírus são recorrentes no cultivo de melancia no Brasil, dentre eles estão: papaya ringspot virus – type watermelon (PRSV-W), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) e watermelon mosaic virus (WMV), que pertencem ao gênero *Potyvirus*; cucumber mosaic virus (CMV), gênero *Cucumovirus*, squash mosaic virus (SqMV), gênero *Comovirus*; zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV), do gênero *Orthospovirus* (Kitajima, 2020).

O groundnut ringspot orthospovirus (GRSV), pertencente ao gênero *Orthospovirus*, foi relatado em melancia no Estado de São Paulo nos últimos anos, causando sintomas de mosaico, deformações e lesões necróticas em folhas e manchas necróticas nos frutos. Alguns testes de transmissão foram realizados, confirmando a transmissão do GRSV por tripes da espécie *Frankliniella schultzei* (Nagata *et al.*, 2004; Leão *et al.*, 2015).

O watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2 (WCLaV-1 e -2), pertencem a família *Phenuiviridae* e foram relatados na China (Xin *et al.*, 2017) e nos Estados Unidos, ocasionando sintomas de mosaico amarelo e deformação foliar em campos de produção (Hernandez *et al.*, 2021). No nordeste brasileiro nos Estados do Piauí, Ceará e Bahia foi confirmada a presença do WCLaV-1 e/ou -2, causando sintomas semelhantes, além disso ambos os vírus estão em infecções mista com GRSV em campos de produção da região nordeste (Maeda *et al.*, 2021).

O gene do nucleocapsídeo de ambos os vírus possui regiões conservadas para os gêneros *Tenuivirus* e *Phlebovirus*, sendo classificados somente a nível de família, *Phenuiviridae* (Xin *et al.*, 2017; Hernandez *et al.*, 2021). No entanto, após novas análises de comparação de sequências de aminoácidos e filogenéticas foi proposto que WCLaV-1 e -2 pertencem ao gênero *Coguvirus*, que apresenta somente três espécies relatadas (Zhang *et al.*, 2021).

### 1.3 Família *Phenuiviridae*

A família *Phenuiviridae* (ordem *Bunyavirales*), possui 20 gêneros reconhecidos. Dentre eles três gêneros se destacam: *Coguvirus*, *Rubodvirus* e *Tenuivirus*, que apresentam genoma com mais de um segmento de RNA (ICTV, 2020; Diaz-Lara *et al.*, 2019).

A proteína estrutural glicoproteína não é presente em vírus classificados nos gêneros *Coguvirus* e *Rubodvirus* (Diaz-Lara *et al.*, 2019). Dentre as proteínas comuns para a família estão presentes: a polimerase de RNA dependente de RNA (RdRP), a proteína de movimento (MP) e a do nucleocapsídeo (NC). Além disso, isolados de espécies do gênero *Coguvirus* podem apresentar duas ORFs

(“open reading frame”) separadas apenas por uma longa região intergênica (IR) rica em UA, adotando conformação de *hairpin*, no mesmo segmento genômico (Navarro *et al.*, 2018a; Zhang *et al.*, 2021).

#### 1.4 Gênero *Coguvirus*

As espécies desse gênero apresentam partícula alongada e flexuosa com aproximadamente 200-300 nm, não envelopados (Navarro *et al.*, 2018a). O gênero apresenta três espécies: *Citrus coguvirus* e *Coguvirus eburni* (anteriormente conhecidas como citrus concave gum-associated virus (CCGaV) e citrus virus A (CiVA), respectivamente, relatadas em laranjeira doce no sul da Itália (Navarro *et al.*, 2018a; Navarro *et al.*, 2018b) e *Grapevine coguvirus*, relatada em videiras (Diaz-Lara *et al.*, 2019). O critério de demarcação estabelecido pelo ICTV para o gênero é de < 95% de identidade na sequência de aminoácidos da RdRP (Kuhn *et al.*, 2020).

Quanto às características genômicas o RNA-1 é monocistrônico, codificando apenas a RdRP e o RNA-2 é ambisenso e bicistrônico, codificando a proteína de nucleocapsídeo (NC) e proteína de movimento (MP). Ambos os segmentos apresentam terminações conservadas na 5' e 3', sendo complementares, proporcionando a formação de uma estrutura secundária, denominada *panhandle*, importante para o processo de replicação viral (Navarro *et al.*, 2018a; Navarro *et al.*, 2018b; Zhang *et al.*, 2021).

Isolados de coguvirus apresentam duas ORFs no RNA-2 separadas por uma IR, adotam a conformação de *hairpin* a partir de um sinal de transcrição terminal putativo (TTS), reconhecido pelo motivo ‘CUCUGCU’ em ambos os sentidos da fita de RNA (Zhang *et al.*, 2021).

#### 1.5 Watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2

O WCLaV-1 e -2 já foram relatados na China (Xin *et al.*, 2017), Estados Unidos (Hernandez *et al.*, 2021) e no Brasil causando sintomas graves associados a infecção de GRSV. Geralmente, as plantas apresentam epinastia, distorção foliar, mosaico, bolhosidade e amarelecimento das nervuras em campos de produção (Fig. 2) (Maeda *et al.*, 2021). Esses vírus podem ser transmitidos mecanicamente (Xin *et al.*, 2017).

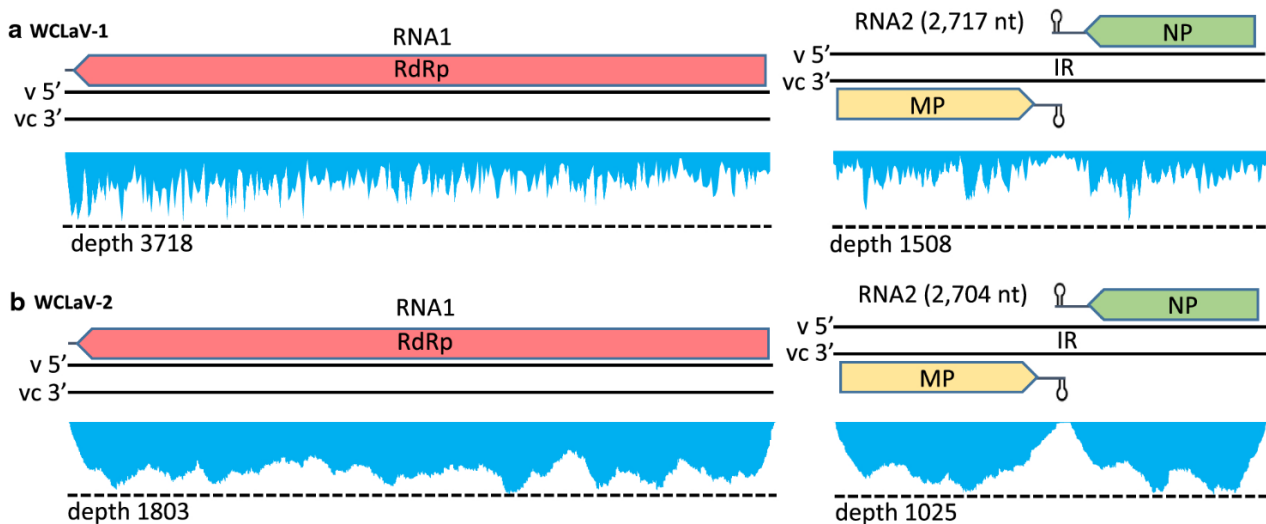


**Figura 2:** Folhas de melancia com sintomas de mosaico, bolhosidade e amarelecimento de nervura (A-C), epinastia, bolhosidade, desvio de cor e deformação foliar (B), sintomas causados por infecção mista de isolados de watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e 2 e groundnut ringspot orthotospovirus em Juazeiro-BA, 2019.

Esses vírus são de RNA fita simples, senso negativo, genoma bi-segmentado e formato de partícula ainda é desconhecido para as espécies virais (Xin *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021). O RNA-1 é o maior segmento com apenas uma ORF codificando a RdRP em ambos os vírus (Fig. 3). A ORF apresenta seis motivos; o motivo A (DATKWC), o motivo B (QGILHYTSS) e o motivo D (KS). O motivo C inclui a sequência SDD, o tetrapeptídeo E (F / Y) xS do motivo E e três resíduos básicos (K, R e R / K) no pré-motivo A e um ácido glutâmico (E) a jusante do pré-motivo A, conservados para membros da ordem *Bunyavirales* (Xin *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021).

WCLaV-1 e -2 foram relatados inicialmente apresentando três segmentos de RNA (Xin *et al.*, 2017). No entanto, a partir de novas análises de high throughput-sequencing (HTS) e sequenciamento por RT-PCR foi demonstrado que WCLaV-1 e -2 apresentam apenas dois segmentos de RNA, que é bicistrônico e ambisenso (Zhang *et al.*, 2021). O RNA-2 de WCLaV-1 e -2 apresentam 2.717 nt e 2.704 nt (Fig. 3), respectivamente, possuem uma região intergênica de 404 nt para WCLaV-1 e 336 nt para WCLaV-2. Essa região rica em U/A não traduzida adota uma conformação de *hairpin*, separando as duas ORFs desse RNA, possibilitando a codificação da MP e NC (Zhang *et al.*, 2021).

Os terminais de cada RNA genômico de WCLaV-1 e -2 apresentam sequências de nucleotídeos complementares entre si, sendo de aproximadamente 20 nt, essa complementariedade facilita a formação de estrutura secundária *panhandle*, fenômeno importante para o processo de replicação de alguns vírus (Zhang *et al.*, 2021).



**Figura 3:** Representação da organização genômica e estratégia de expressão de genes de WCLaV-1 e -2. RdRp: polimerase de RNA dependente de RNA; MP: proteína de movimento putativo; NP: proteína do nucleocapsídeo.

**Fonte:** Zhang *et al.*, 2021.

Análises filogenéticas mostraram que WCLaV-1 e -2 são estreitamente relacionados com *Citrus coguvirus* e *Coguvirus eburi*, gênero *Coguvirus*, pois apresentam mesma organização e estrutura genômica, sequências terminais e região intergênica muito semelhantes; assim, foi proposto que WCLaV-1 e -2 sejam novas espécies do gênero *Coguvirus*, com os seguintes nomes sugeridos: *Coguvirus citrulli* e *Coguvirus henani*, respectivamente (Zhang *et al.*, 2021).

### 1.6 Sorologia aplicada à virologia vegetal

Diversos métodos são utilizados para detectar e identificar vírus de plantas como métodos sorológicos, biológicos e moleculares, todos os métodos se tornam essenciais, dependendo da aplicação, para gerar medidas de controle eficientes (Lima, 2009).

A sorologia é uma técnica muito utilizada para detectar/identificar vírus vegetais, além de ser um método sensível, acurado e de baixo custo, possibilita a identificação de agentes causais de viroses que ocorrem em campo (Ling *et al.*, 2000; Agrios, 2004; Lima, 2009). O teste ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) é o teste sorológico mais comum na detecção de vírus de planta, o teste consiste em ligação específica entre antígeno e anticorpo e geralmente os anticorpos produzidos são provenientes de proteína estrutural como capa proteica ou nucleocapsídeo (Clark & Adams, 1977).

Para testes de “dot-blot immunobinding assay (DIBA)” ou dot-ELISA, são utilizadas fitas de nitrocelulose com amostras de extrato vegetal fixadas, mostrando resultado a partir de reação de enzima/substrato (Lima, 2009). A facilidade e praticidade do teste proporciona analisar grande

número de amostras com menor custo quando comparado a testes moleculares e possibilita realizar levantamentos de distribuição geográfica do agente etiológico (Lima, 2009).

No entanto, a produção de anticorpos contra partículas virais purificadas apresenta limitações, como a dificuldade em purificação de vírus devido à baixa concentração no tecido vegetal ou impossibilidade de inoculação mecânica, instabilidade da partícula, reação cruzada de vírus parecidos ou do mesmo gênero e infecção mista (Colariccio *et al.*, 2000; Hull, 2013). A utilização de *Agrobacterium* e plantas como sistema de expressão transiente para genes recombinantes pode superar essa problemática. (Krenek *et al.*, 2015).

## 1.7 Expressão heteróloga de genes em plantas

Nos últimos anos, a expressão transiente de genes utilizando células de *Agrobacterium* e plantas tem sido difundida para estudos de função proteica, interação patógeno-hospedeira, produção de biofarmacêuticos e produtos biotecnológicos (Daniell *et al.*, 2009; Krenek *et al.*, 2015). A técnica utiliza a infiltração de uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* recombinante em tecido foliar, essa prática facilita a transferência de T-DNA para as células da planta (Obembe *et al.*, 2011). Uma possível desvantagem desse método é que a expressão transiente dura poucos dias (Penney *et al.*, 2011; Obembe *et al.*, 2011).

Os vetores de vírus vegetais de expressão de genes são utilizados devido ao potencial de produzir grande quantidade de proteínas recombinantes de interesse em pouco tempo (Hefferon, 2012). Entretanto, a produção de proteína é variável devido diferentes fatores, como exemplo, o vetor a ser utilizado e o desenho de genes. O tobacco rattle virus (TRV), pertencente a gênero *Tobravirus*, é um exemplo de vetor de silenciamento genético induzido por vírus (VIGS), induz sintomas leves, infecta grandes áreas de células adjacentes por movimento célula-célula e pode silenciar a expressão genética em pontos de crescimento do hospedeiro (Ratcliff *et al.*, 2001).

As características do vetor viral TRV são atraentes, pois a ativação da imunidade desencadeada por PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) é menos intensa quando comparada a outros vetores virais, como tobacco mosaic virus (TMV) (Kumagai *et al.*, 1995), tomato golden mosaic virus (TGMV) (Kjemtrup *et al.*, 1998) e potato virus X (PVX) (Ruiz *et al.*, 1998), mas o TRV é ausente no Brasil e a utilização desse vetor viral seria complicada devido barreiras fitossanitárias (Ratcliff *et al.*, 2001; Tavares-Esashika *et al.*, 2020).

O único vírus presente no Brasil com características similares ao vetor viral de TRV é o pepper ringspot virus (PepRSV), pertencente ao gênero *Tobravirus*, que foi utilizado para construção de um

novo vetor viral com capacidade de expressão genética e vetor VIGS, promovendo silenciamento gênico com eficiência (Tavares-Esashika *et al.*, 2020).

Além do vetor a ser utilizado para expressão gênica existem outros fatores que podem colaborar para a produção de proteína heteróloga em plantas, como adição de ácido lipóico, pluronic F-68, polivinilpirrolidona, aumento da concentração de acetosyringone (500  $\mu$ M) e tratamento térmico a 37 °C. Esses fatores ajudam na expressão dos genes *Vir* de *Agrobacterium tumefaciens*, gerando maior tendência de expressão da proteína alvo (Norkunas *et al.*, 2018).

Novos protocolos de clonagem foram desenvolvidos para otimizar a construção dos genes recombinantes no vetor PepRSV. O método Gibson Assembly® (GA) é uma técnica de recombinação isothermal, que é aplicada para juntar dois ou mais fragmentos de DNA, previamente preparados por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), com sequências sobrepostas; a reação contém exonuclease T5, polimerase de DNA termoestável e ligase de DNA termoestável (Gibson *et al.*, 2009). A técnica é atraente já que não utiliza enzimas de restrição, é realizada em poucos passos, sendo o produto final sem cortes ou lacunas (Blawid & Nagata, 2015).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção das amostras de melanciaira**

Amostras de folha de melanciaira apresentando sintomas de mosaico, amarelecimento das nervuras, epinastia, bolhosidade e deformação foliar foram coletadas em 2019 e 2020 nos municípios de Juazeiro (Bahia) e Mossoró (Rio Grande do Norte), respectivamente. As amostras foram acondicionadas em ultra freezer -70 °C, previamente identificadas, nas dependências do laboratório de Virologia Geral do Departamento de Biologia Celular, na Universidade de Brasília.

### **2.2 Detecção de WCLaV-1, WCLaV-2 e GRSV por RT-PCR em amostras de campo, sequenciamento Sanger e análise filogenética**

Para amostras de tecido foliar de melanciaira estocados em ultra freezer -70 °C foi realizada extração de RNA total com o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Realizou-se a detecção de WCLaV-1 e -2 por RT-PCR usando primers específicos, WCLaV-1vNP (CGAATAGACTCTGGAGGGTAGA) e WCLaV-1cNP (GAAAGCAAGAAAGCTGGCTAAA); e WCLaV-2vNP (ATTCCCAGTGAGAGCAACAA) e

WCLaV-2cNP (GAGGTGGAGGTAGGAAAGAAAG) (Hernandez *et al.*, 2021) e para GRSV com primers específicos, viral (GTGCATCATCCATTGTAAATCC) e antiviral (CGCCAAAGATCATGAAAG) (Maeda *et al.*, 2021). Para a produção do cDNA foi utilizada a enzima SuperScript™ IV (Thermo Fisher Scientific) para transcrição reversa (RT). A reação consistiu de 7 µL de RNA total, 1 µL de primer específico (50 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM) e incubação por 75 °C por 5 minutos. Após isso, foram adicionados 4 µL de 5X SSIV Buffer, 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de SuperScript IV (200 U/µL) e 1 µL de RNaseOUT (40 U/µL, Thermo Fisher Scientific). A reação foi incubada por 1 hora a 50 °C e posteriormente a 75 °C por 20 minutos para inativação da enzima. Para a PCR foram utilizados os primers específicos de WCLaV-1, WCLaV-2 e GRSV com a enzima Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil), seguindo as instruções da fabricante. A reação foi incubada a partir de uma temperatura de *hotstart* manual de 80° C por 1 minuto, seguida por uma pré-desnaturação a 94 °C por 3 minutos e mantida por 35 ciclos sob uma temperatura de desnaturação de 94 °C por 30 segundos, anelamento de 55-65 °C por 30 segundos e de extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida por incubação a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% e observou-se amplicons de tamanhos esperados de aproximadamente 450 pb, 780 pb e 440 pb para GRSV, WCLaV-1 e -2, respectivamente.

Os amplicons de WCLaV-1 e -2 foram purificados usando Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido), quantificados e sequenciados por método Sanger.

Para análise filogenética dos isolados sequenciados, foram utilizadas sequências do nucleocapsídeo de espécie do gênero *Coguvirus* submetidas a múltiplos alinhamentos de sequência usando o método Clustal W e depois com o modelo *Neighbor-joining* com o software MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

### **2.3 Preparação cDNA do inserto de WCLaV-1 e -2 usando transcrição reversa (RT) e amplificação por PCR para clonagem**

Os insertos utilizados são provenientes do gene do nucleocapsídeo (NC) completo de WCLaV-1 e WCLaV-2 e gene de hexahistidina foi adicionando na extremidade 3'. A síntese do cDNA foi realizada por RT usando a enzima SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo do fabricante. Os primers específicos para a produção da cDNA dos insertos de WCLaV-1 e -2 foram: WCLaV-1-NC Rev (ATGATGGTGGTGGTGGTGAAGCTGACTGATGTCAGACA) e WCLaV-2-



NC Rev (ATGATGGTGGTGATGATGATTGAAGCTCATAACAGCTGA). Para a PCR foram utilizados os mesmos primers da RT combinados a primers *forward* específicos: WCLaV-1 NC For (CTGCAATCACCTGCGCAAATGGACCACACTAACGCAG) e WCLaV-2 NC For (CTGCAATCACCTGCGCAAATGTCTTCTTCTTCAAGAACAAAC), ambos os primers estão marcados com cauda de histidina e possuem sobreposições. A reação foi realizada com a enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A confirmação da amplificação dos insertos foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% com amplicon de 1000 pb.

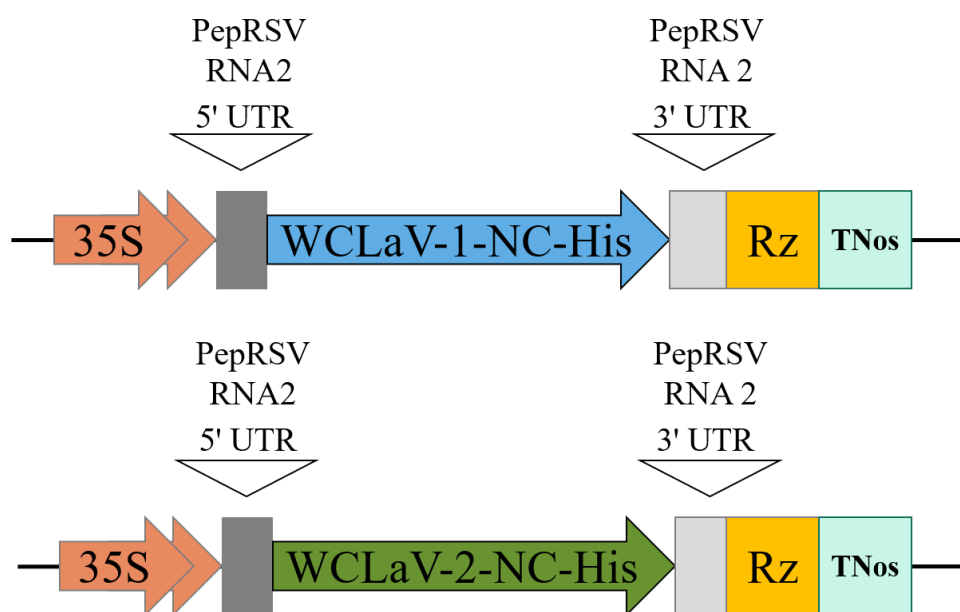
## 2.4 Preparação do vetor viral para clonagem

O vetor viral utilizado foi desenvolvido a partir do vírus PepRSV, inserido no vetor binário pJL89 (Tavares-Esashika *et al.*, 2020). A construção utilizada consiste na deleção total do gene da capa proteica (CP) (Andrade *et al.* 2021). Foi realizada a transfecção por eletroporação da construção Mod5 em célula competente de *Escherichia coli* cepa DH10B (Thermo Fisher Scientific) e selecionado células transformadas. Para purificação dos clones selecionados foi utilizado o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, Madison, EUA). A amplificação do *backbone* por PCR foi realizada com os primers Backbone\_Moldes\_His\_For (CATCATCACCACCATCAT) e Pep R2-noCP Rev (TTTGCGCAGGTGATTGCAG) (Tavares-Esashika, 2021), com a enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, seguindo instruções do fabricante. A confirmação da amplificação do vetor foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% com fragmento de 7000 pb.

## 2.5 Produção de DNA recombinante utilizando Gibson Assembly e agroinfiltração

Os amplicons dos insertos e vetor foram purificados usando Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, EUA) e quantificados. Realizou-se as reações de Gibson Assembly (GA) (Gibson Assembly Cloning Master Mix, New England Biolabs) seguindo as orientações do fabricante. O produto final da reação de GA foi transformado em célula de *E. coli* e incubados a 28 °C por 2 dias (Blawid & Nagata, 2015). Como o vetor viral de PepRSV está inserido em um vetor binário, foi possível a transformação em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101::pMP90 (Tavares-Esashika *et al.*, 2020) com a construção de NC\_WCLaV-1-RNA2 e NC\_WCLaV-2-RNA2, separadamente (Fig. 4). Os transformantes e o RNA-1 de PepRSV foram

inoculadas em meio LB3, separadamente, por 24 horas e induzidas (Bucher *et al.*, 2003). A mensuração da OD600 de células do *A. tumefaciens* foi verificada e ajustada para concentração final de 2.0. As culturas das construções do RNA-1, NC\_WCLaV-1-RNA2 e NC\_WCLaV-2-RNA2 foram centrifugadas a  $5000 \times g$  por 5 minutos. Os pellets foram ressuspensos com 2 mL de solução do meio Murashige-Skoog (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) contendo 1 M MES (pH 5,6) e  $50 \mu\text{M}$  de acetosyringone. Para agroinfiltração 1 mL de cada construção foi misturada a 1 mL do RNA-1, sendo infiltrados 2 mL de cada construção em plantas de *N. benthamiana* no lado abaxial das folhas com auxílio de seringas sem agulha. Após 4 dias as folhas foram armazenadas em microtubos para análise de expressão por *Western blotting*.



**Figura 4:** Região do T-DNA das construções após clonagem dos insertos de WCLaV-1 e -2 e vetor viral PepRSV. RNA-2 (M3B) em vetor binário pJL89. 35S, promotor do cauliflower mosaic virus; 5' UTR do RNA-2 de PepRSV, inserto do gene do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 com HisTag, 3' UTR do RNA-2 de PepRSV, Rz: ribozima do hepatitis delta virus; TNos: terminador NOS.

## 2.6 Sequenciamento Sanger para validação das construções de NC WCLaV-1-RNA2 e NC WCLaV-2-RNA2

Para confirmação das sequências do DNA recombinante produzido de WCLaV-1 e -2 foi realizada a PCR de colônia com primers específicos CAM\_Seq\_Primer\_254\_For (CGAACGCTCTTGTTAAATCA) e Ag1CAM\_Primer\_1120\_Rev (TCACACTAAACCGTATGGAG) (Tavares-Esashika *et al.*, 2021) que possibilitam a amplificação

de todo o produto clonado. A reação foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia), seguindo as instruções da fabricante. A reação foi incubada a partir de uma temperatura de *hotstart* manual de 80 °C por 1 minuto, seguida por uma pré-desnaturação a 94 °C por 3 minutos e mantida por 35 ciclos sob uma temperatura de desnaturação de 94 °C por 30 segundos, anelamento de 55 °C por 1 minuto e de extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida por incubação a 72 °C por 10 minutos. O produto do PCR foi purificado com o Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), quantificados e sequenciados.

## **2.7 Western blotting para confirmação da expressão heteróloga da proteína do nucleocapsídeo de WCLaV -1 e -2 em plantas**

Para confirmação da expressão heteróloga da proteína do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2, as folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas foram maceradas em tampão PBS 1× na proporção de 1:1. O extrato foi fervido por 5 minutos para desnaturação de proteínas. Posteriormente, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, sendo um gel para transferência de proteínas em membrana de Nitrocelulose (Hybond-C membrane, GE Healthcare Life Sciences) para *Western blotting* e outro para corar com “Comassie Blue”.

O SDS-PAGE foi submetido a coloração de “Comassie Blue” (Comassie 0,25%, metanol 50%, ácido acético 7%) e descorado com solução descorante (ácido acético 10%, etanol 30%) para visualização de bandas proteicas. Para a transferência das proteínas do gel para membrana de Nitrocelulose, utilizou-se o Transblot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, EUA) sob 1.3 A, 25 V por 20 minutos. Após transferência a membrana foi bloqueada em solução contendo 10 mL PBS 1× Tween 0,1% e leite em pó desnatado 2% (tampão de bloqueio) por 30 minutos. Adicionou-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti-HisTag (que reconhece HisTag adicionado no terminal-C de proteína do nucleocapsídeo) diluído na proporção de 1:3000 (0,33 µg/mL) em tampão de bloqueio (2% de leite em pó desnatado) e a membrana foi colocada sob agitação por uma hora.

Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por 3 minutos em PBS 1× Tween 0,1% e incubada por uma hora com anticorpo secundário anti-mouse- IgG fosfatase alcalina conjugado na proporção de 1: 3000 (0,33 µg/mL) em tampão PBS 1×. Após lavagem da membrana com PBS 1× Tween 0,1%, a mesma foi incubada com 66 µL de NBT 10 mg/mL (Nitro-BlueTetrazolium em dimetilformamida 70%) e 33 µL de BCIP 10 mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato em dimetilformamida 100%) por 5 minutos sob agitação. A presença das proteínas foi confirmada

comparando o tamanho esperado de, aproximadamente, 40 kDa com o marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

## 2.8 Agroinfiltração a vácuo de *Nicotiana benthamiana* com as construções de NC WCLaV-1-RNA2 e NC WCLaV-2-RNA2

Para agroinfiltração a vácuo 60 plantas de *N. benthamiana* foram utilizadas com seis semanas de idade, sendo 30 plantas para a construção NC\_WCLaV-1-RNA2 e 30 plantas para a NC\_WCLaV-2-RNA2. As células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com cada construção no RNA-2 de PepRSV e o RNA1 de PepRSV foram inoculadas em meio LB3, separadamente, por 24 horas e induzidas (Bucher *et al.*, 2003). A mensuração da OD600 de células do *A. tumefaciens* transformadas foi verificada e ajustada para concentração final de 2.0. As culturas das construções do RNA-1, NC\_WCLaV-1-RNA2 e NC\_WCLaV-2-RNA2 foram centrifugadas em garrafas plásticas a 5000 × g por 20 minutos. Os pellets foram ressuspensos em 500 mL de solução do meio Murashige-Skoog (Sigma-Aldrich) contendo 1 M MES (pH 5,6) e 50 µM de acetosyringone). Para agroinfiltração a vácuo 500 mL de cada construção foi misturada a 500 mL do RNA-1 de PepRSV, obtendo um volume final de 1 L de suspensão para cada construção. As folhas das plantas foram colocadas dentro da suspensão bacteriana na câmara de vácuo (Fig. 5), submetidas a pressão de 50 cmHg por três vezes. Após isso, as plantas foram colocadas em câmara úmida por 1 hora e dispostas em câmara de crescimento.



**Figura 5:** Infiltração a vácuo de *Nicotiana benthamiana* em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* com construções de WCLaV -1 e -2.

## 2.9 Purificação de proteína do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2

Para a extração das proteínas do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2, 60 g de tecido foliar de *N. benthamiana* agroinfiltrada foram macerados com nitrogênio líquido em almofariz e triturados em tampão de extração (50mM de Tris base, 150 mM de NaCl; 30 mM de imidazol, triton X-100 0,2%) pH 7.1,  $\beta$ -mercaptoetanol 14000 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 150 mM. O extrato foliar foi filtrado e centrifugado ( $10000 \times g$ ) por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de bomba de vácuo e Kitassato, transferidos para novos tubos tipo falcon e centrifugados a  $10000 \times g$  por 20 minutos. Após isso, o sobrenadante foi recolhido e adicionado a tubos tipo Falcon com 250  $\mu$ L da resina HirPur<sup>TM</sup> Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific) cada, a mistura foi incubada por uma hora em câmara fria sob agitação. Ao fim da incubação, os tubos foram centrifugados ( $700 \times g$ ) por 5 minutos para precipitação da resina e o sobrenadante foi descartado.

Para o processo de eluição da resina, foi realizado um teste prévio com diferentes concentrações de imidazol (60 mM, 80 mM, 100 mM, 150 mM, 180 mM, 200 mM, 250 mM e 500 mM) afim de verificar qual concentração possibilitaria obter quantidade de proteína com mínimo de impurezas. Com isso, foi utilizado para a NC de WCLaV-1 30 mL tampão de eluição (50 mM de Tris base, 300 mM de NaCl, 150 mM de imidazol, triton X-100 0,2%) pH 7,1 e para a NC de WCLaV -2 40 mL tampão de eluição (50 mM de Tris base, 300 mM de NaCl, 250 mM de imidazol, triton X-100 0,2%) pH 7,1, repetindo a lavagem por três vezes com centrifugações ( $700 \times g$ ) por 2 min. Para eluição em coluna com filtro, todo o volume de resina foi transferido para a coluna e a mesma lavada três vezes com os respectivos tampões de eluição. A eluição completa das proteínas foi realizada utilizando tampão de eluição (50 mM de Tris base, 300 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, Triton X-100 0,2%) pH 7,1 e coletados 14 mL.

As proteínas eluidas foram centrifugadas a  $4000 \times g$  por 40 minutos em tubos Amicon Ultra-15 MWCO 30 kDa com objetivo de concentrá-las. Após isso, foram adicionados 15 mL de PBS 1 $\times$  filtrado e centrifugados a  $4000 \times g$  por 20 minutos com intuito de retirar resíduos de imidazol presentes nas amostras. As proteínas purificadas foram aliquotadas e estocadas em ultra freezer -70 °C.

## 2.10 Quantificação de proteína

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método Bradford (Kruger, 2009). Para o procedimento cubetas de acrílico foram preparadas e utilizou-se como padrão albumina do soro bovino (BSA). A leitura de absorvância em espectrofotômetro foi feita em 595 nm.

### **2.11 Western blotting e coloração de prata das proteínas purificadas do nucleocapsídeo de WCLaV -1 e -2 para verificação da qualidade**

Para verificação da qualidade das proteínas purificadas, 20 µL de cada proteína foi fervida com tampão de carregamento por 5 minutos e incubada no gelo por 2 minutos para desnaturar as proteínas. Posteriormente, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, sendo um gel para transferência em membrana de Nitrocelulose (Hybond-C membrane) e outro para coloração de prata. A transferência para membrana de nitrocelulose foi utilizada para detectar as proteínas via *Western blotting*, utilizando anticorpo monoclonal de camundongo anti-HisTag diluído na proporção de 1:3000 (0,33 µg/mL) e anticorpo secundário anti-mouse- IgG fosfatase alcalina conjugado na proporção de 1:3000 (0,33 µg/mL). A presença das proteínas foi confirmada comparando o tamanho esperado de, aproximadamente, 40 kDa com o marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

O gel para coloração de prata foi aquecido com 30 segundos em microondas e incubado em solução fixadora de ácido acético 5% para as proteínas serem fixadas no gel de poliacrilamida. Após a fixação, o gel foi colocado em uma solução de 0,02% de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), sendo aquecido por 30 segundo e incubado por 2 minutos em agitação. Após a sensibilização o gel foi aquecido e lavado duas vezes com água destilada. Após isso, o gel foi colocado em solução nitrato de prata de 0,1% (AgNO<sub>3</sub>). Realizou-se uma lavagem com água para retirar excesso de nitrato de prata e adicionou-se a solução reveladora [3% carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,4), 0,05% de formaldeído]. A coloração foi interrompida com uma solução de 5% ácido acético na água (Gharib *et al.*, 2009). A qualidade das amostras foi observada de acordo com bandas de outras proteínas que poderiam estar presentes nas amostras.

### **2.12 Produção de antissoro policlonal de WCLaV-1 e -2**

Para a produção de antissoro policlonal, realizou-se a imunização em coelhos, raça Nova Zelândia Branca, para cada proteína purificada. Utilizou-se, aproximadamente, 0,33 mg de antígeno por injeção subcutânea com intervalo de 21 dias, totalizando três injeções. A primeira injeção, os

antígenos foram emulsificados com adjuvante Freund's completo e as outras duas foram aplicadas com adjuvante Freund's incompleto.

Posteriormente as três injeções, foi realizada a coleta de sangue, aproximadamente 20 mL, uma vez por semana através de perfurações pequenas na orelha dos coelhos. Após cada coleta o sangue foi mantido a 37 °C por 1 h e refrigerado a 4 °C. O sangue coagulado foi submetido à centrifugação de 4000 × g por 20 minutos para coleta do sobrenadante contendo o antissoro bruto. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -20 °C para testes de dot-ELISA, afim de avaliar a eficiência dos antissoros policlonais brutos produzidos.

Para o processo de purificação do antissoro foi realizada a absorção cruzada com adição de extrato de planta ao soro bruto na proporção de 1:1 e incubados a 4 °C. A mistura foi centrifugada a 10000 × g por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e diluído com 9,5 mL de água ultrapura. Para precipitação de proteína foi adicionado 9,5 mL de uma solução saturada de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) gota-a-gota e incubado a 4 °C por 4 horas. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 4500 rpm por 30 minutos, o pellet formado foi ressuspenso com 1 mL de ½ PBS pH 6,5 (PBS 10 X = 1,4 M NaCl + 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 8 mM NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O + 2 mM KCl, pH 6,5). O soro bruto foi submetido a três diálises em tubos de nitrocelulose (Dialysis Tubing, Sigma-Aldrich) em agitação com ½ PBS pH 6,5 com intervalo de 2 horas para cada diálise.

A imunoglobulina dialisada foi purificada com resina (DEAE Sephacel™ Amersham Biosciences, GE Healthcare Life Sciences), que previamente foi equilibrada em coluna com a mesma solução de diálise. O volume total de imunoglobulina dialisada foi adicionado a coluna, eluída com 6 mL de ½ PBS pH 6,5 e coletado. Realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm, o IgG-purificado foi diluído para a concentração de 1 mg/mL e armazenado a -20 °C.

### **2.13 Inoculação mecânica dos isolados de WCLaV-1 e -2**

Para a inoculação mecânica três amostras de tecido foliar de campo com infecção mista de WCLaV-1, WCLaV-2 e GRSV, foram maceradas e homogeneizadas em 10 mL 0,02 M tampão fosfato (TF) (pH = 7,2), foram utilizadas quatro mudas de melancia de duas cultivares diferentes, totalizando oito plantas. Uma planta de cada cultivar foi inoculada mecanicamente com uma amostra de campo. Plantas inoculadas apenas pelo TF foram utilizadas como controles negativos. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em uma câmara de crescimento a 25 °C e 70% de umidade relativa com 16 h de luz/8 h escuras. As plantas inoculadas foram testadas para infecção por vírus por ensaios de Dot-ELISA e RT-PCR (itens 2.14; 2.15).

## **2.14 Dot-ELISA para avaliar eficiência e sensibilidade de antissoros brutos**

Para avaliar a reatividade e sensibilidade dos antissoros policlonais para WCLaV-1 e -2, foram utilizados os antissoros brutos provenientes da 1ª sangria realizando adsorção cruzada. Quanto as amostras testadas, foram utilizadas plantas inoculadas mecanicamente e controle sadia (item 2.13) e diferentes concentrações (1 µg; 0,1 µg; 0,01 µg; 0,001 µg) da NC expressa purificada (item 2.9), previamente fixadas em membrana de nitrocelulose, para cada antissoro produzido afim de avaliar sensibilidade.

As amostras de tecido foliar de melancia inoculadas mecanicamente e sadia foram maceradas em tampão PBS 1 × na proporção de 1:20, as amostras foram centrifugadas 13000 rpm por 3 minutos e 2 µL do sobrenadante foi aplicado em fitas de membrana de nitrocelulose Amersham Potran, 0,45µm (GE Healthcare Life Sciences). As membranas foram mantidas a temperatura ambiente por 1 hora para secagem e armazenadas na geladeira. Para o teste sorológico, as fitas foram incubadas em solução de bloqueio (tampão PBS 1×, 2% de leite em pó desnatado) por 30 minutos sob agitação permanente. Para adsorção cruzada o soro bruto foi incubado com 1 mL de solução de bloqueio + 1 mL de suco de planta sadia durante 30 minutos. Em seguida, adicionou-se o antissoro policlonal produzido na proporção de 1:3000 (0,33 µg/mL) e incubados sob agitação por 1 hora. Após a incubação a membrana foi lavada três vezes com tampão de lavagem (PBS 1 × + 0,1% tween-20) em agitação, e adicionou-se 10 mL de PBS 1 × contendo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate, Sigma-Aldrich) diluído 1:3000 (0,33 µg/mL) por 1 hora, sob agitação. Para retirar anti-IgG livres, realizou-se três lavagens com tampão de lavagem em agitação. Posteriormente, foi adicionado o tampão de revelação alcalino [100 mM NaCl + 100 mM Tris-base + 5 mM MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O), pH 9,5], 10 mg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil, Sigma-Aldrich) e 10 mg/mL de NBT (nitro blue tetrazolium chloride, Sigma-Aldrich) para avaliar ligação entre o antígeno e o anticorpo. Para o processo de revelação ocorrer a membrana foi incubada no escuro, sob agitação lenta, por aproximadamente 5 minutos, a solução reveladora foi descartada e adicionou-se água. Avaliação foi feita baseada na mudança de coloração das amostras comparando o controle positivo (planta infectada) e controle negativo (planta sadia).

## **2.15 RT-PCR para detecção de GRSV, WCLaV-1 e -2 em amostras testadas por Dot-ELISA**

Realizou-se a extração de RNA total utilizando TRIzol RNA Isolation Reagents (Thermo fisher Scientific) das amostras testadas por dot-ELISA. Para a produção do cDNA foi utilizada a enzima



transcriptase reversa M-MLV™ (Thermo Fisher Scientific). A reação consistiu de 10 µL de RNA total, 1 µL de primer específico (50 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM) e incubação por 65 °C por 5 minutos. Após isso, foram adicionados 4 µL de 5 × First Strand Buffer, 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de M-MLV (200 U/µL) e 1 µL de RNaseOUT (40 U/µL, Thermo Fisher Scientific). A reação foi incubada a 23 °C por 10 minutos, 1 hora a 37 °C e posteriormente a 75 °C por 15 minutos para inativação da enzima. Para a PCR foi utilizado os primers específicos de WCLaV-1, WCLaV-2 e GRSV com a enzima Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia), seguindo as instruções da fabricante. A reação foi incubada a partir de uma temperatura de *hotstart* manual de 80° C por 1 minuto, seguida por uma pré-desnaturação a 94 °C por 3 minutos e mantida por 35 ciclos sob uma temperatura de desnaturação de 94 °C por 30 segundos, anelamento de 55-65 °C por 30 segundos e de extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida por incubação a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% e observou-se amplicons de tamanhos esperados de aproximadamente 450 pb, 780 pb e 440 pb para GRSV, WCLaV-1 e -2, respectivamente.

### **2.16 Predição de epítomos semelhantes para WCLaV-1 e -2**

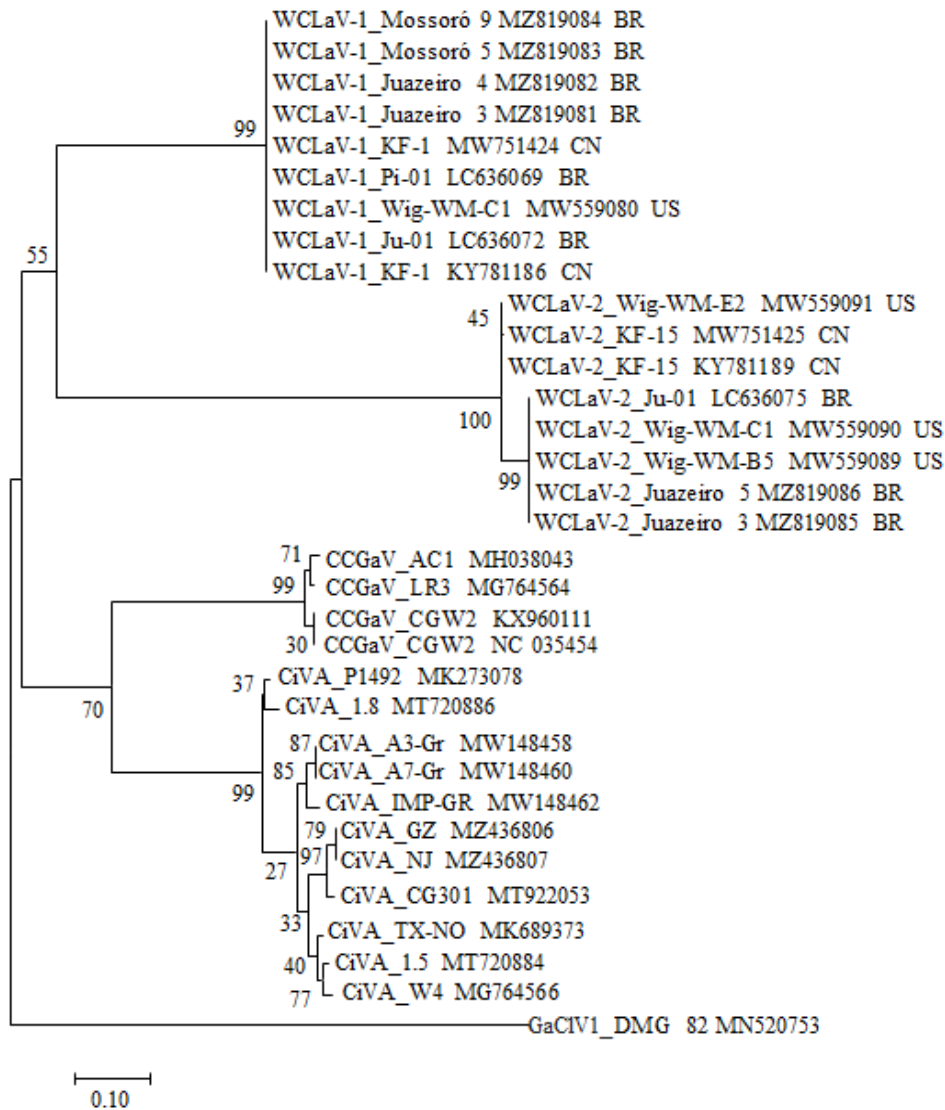
Para verificar possíveis epítomos semelhantes entres as proteínas recombinantes sintetizadas, suas sequências de aminoácidos foram submetidas ao Phyre2 ([www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2)), site que prevê estruturas de proteínas. Posteriormente, o arquivo.pdb foi comparado com o banco de dados de epítomos imune (IEDB) utilizando o programa Ellipro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>), que atribui uma *protrusion score* para cada resíduo em uma proteína antigênica e identifica locais de epítomos com agrupamentos de resíduos com altos escores de ElliPro. Para comparação das proteínas e visualização de imagens 3D foi utilizada a função de alinhamento de estrutura do software PyMOL (<https://pymol.org/2/>).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Análise filogenética dos isolados de WCLaV-1 e -2 obtidas de amostras de campo**

A análise de sequências usando o CLUSTALW indicou que os isolados 3 e 4 de Juazeiro (J3 e J4) e os isolados 5 e 9 de Mossoró (M5 e M9) apresentam 99% de identidade nucleotídica com isolados de WCLaV-1 da China (MW751424; KY781186), dos Estados Unidos (MW559080) e Brasil (LC636069; LC636072) (Fig. 6). Os isolados de Juazeiro (J3 e J5) apresentaram 99% de identidade com isolado de WCLaV-2 da China (MW751425; KY781189), dos Estados Unidos (MW559090;

MW559089; MW559091) e do Brasil (LC636075) (Fig. 6). O modelo *Neighbor-joining* foi utilizado para construir árvore filogenética usando o MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), foi gerada a partir de seqüências de nucleotídeos do nucleocapsídeo de espécies do gênero *Coguvirus* e confirmou a presente de WCLaV-1 e -2 em amostras de campo da Bahia e Rio Grande do Norte.



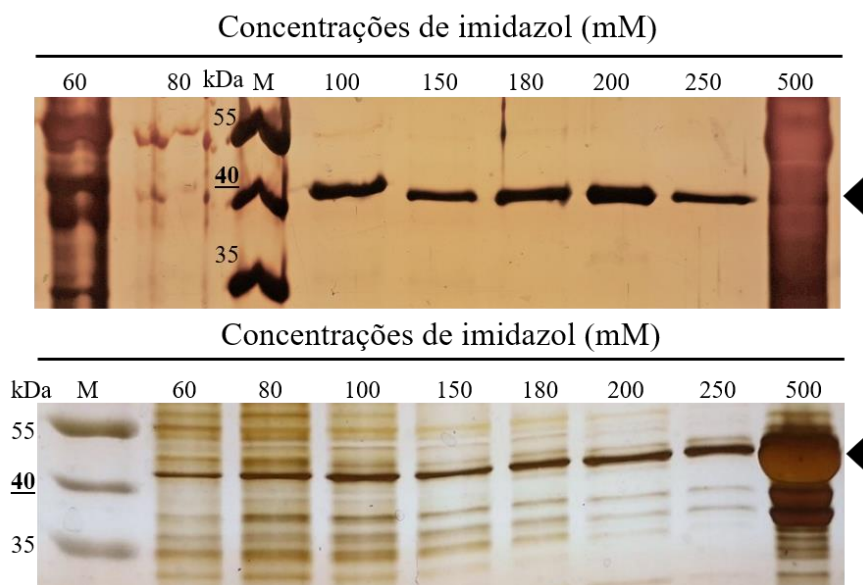
**Figura 6:** Árvore filogenética composta por seqüência de nucleotídeos do nucleocapsídeo de espécies do gênero *Coguvirus* com seus respectivos números de acesso. Valores de bootstrap (500 repetições) e o número de acesso de cada seqüência é indicado.

### 3.2 Purificação e qualidade das proteínas recombinantes do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 obtidas

A partir da confirmação e identificação correta dos isolados de WCLaV-1 e -2 (item 3.1), foi possível a amplificação dos genes alvos (nucleocapsídeo) e clonagem no vetor PepRSV. Realizou-se a

expressão heteróloga dos genes em plantas de *N. benthamiana*, a partir das construções preparadas (item 2.5), e posteriormente a purificação das proteínas recombinantes.

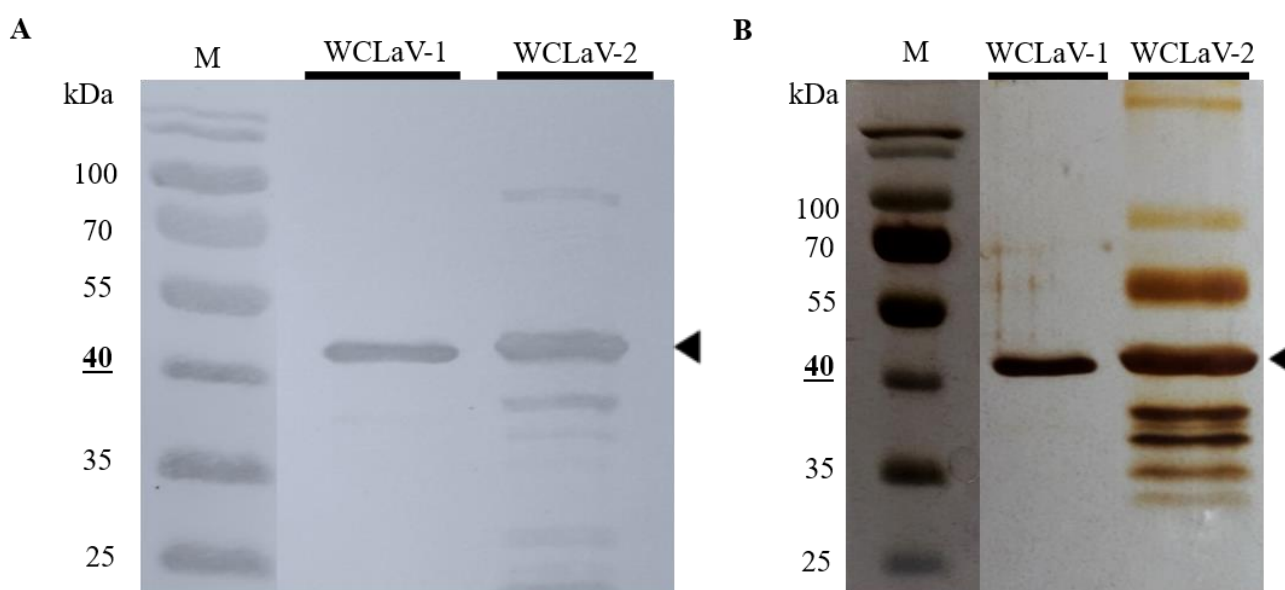
Para realização da purificação das proteínas recombinantes, fez-se necessário ajustar a concentração de imidazol, no processo de lavagem da coluna. Esta adaptação no processo de purificação é importante, já que garante a eliminação de impurezas presentes na amostra. Nesse sentido, as eluições realizadas com diferentes concentrações de imidazol (mM), para as proteínas alvo, foram coletadas, e observadas a partir de SDS-PAGE submetido a coloração de prata. A coloração de prata é uma técnica sensível que possibilita observar bandas proteicas em baixas concentrações, assim bandas de tamanhos diferentes da proteína alvo são consideradas impurezas. Com este ensaio foi possível concluir que as concentrações de imidazol que possibilitaram agregar quantidade e qualidade de proteínas purificadas de WCLaV-1 e -2 foram 150 mM e 250 mM (Fig. 7), respectivamente. Para o processo de eluição completa das proteínas foi determinada a concentração de 500mM de imidazol (Fig. 7). A concentração final das proteínas expressadas purificadas de WCLaV-1 foi 1,25 mg/mL e para WCLaV-2 foi 3,5 mg/mL.



**Figura 7:** Coloração de prata para avaliação de diferentes concentrações de imidazol para eluição das proteínas do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 expressadas em plantas de *Nicotiana benthamiana*. O tamanho esperado das proteínas purificadas de WCLaV-1 e -2 é de aproximadamente 40 kDa. M: marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Para as proteínas purificadas foi realizado um SDS-PAGE, com intuito de separar por eletroforese as proteínas a serem avaliadas, e posteriormente submetido a *Western blotting* e coloração de prata. O *Western blotting* possibilitou observar as bandas das proteínas recombinantes de WCLaV-

1 e -2 (Fig. 8A) marcadas com HisTag, utilizando anticorpo primário anti-His, confirmando a expressão heteróloga das proteínas em plantas e a possibilidade da purificação por cromatografia de afinidade a partir de plantas agroinfiltradas. Comparando os resultados da coloração de prata (Fig. 8A) e *Western blotting* (Fig. 8B), pode-se concluir que a NC de WCLaV-1 foi adequada, já que não apresentou impurezas consideráveis na coloração de prata (Fig. 8B) e para a NC de WCLaV-2, obteve-se a proteína recombinante parcialmente purificada devido a presença de dímeros e fragmentação da proteína, (Fig. 8B). As proteínas foram consideradas adequadas para imunizar coelhos.

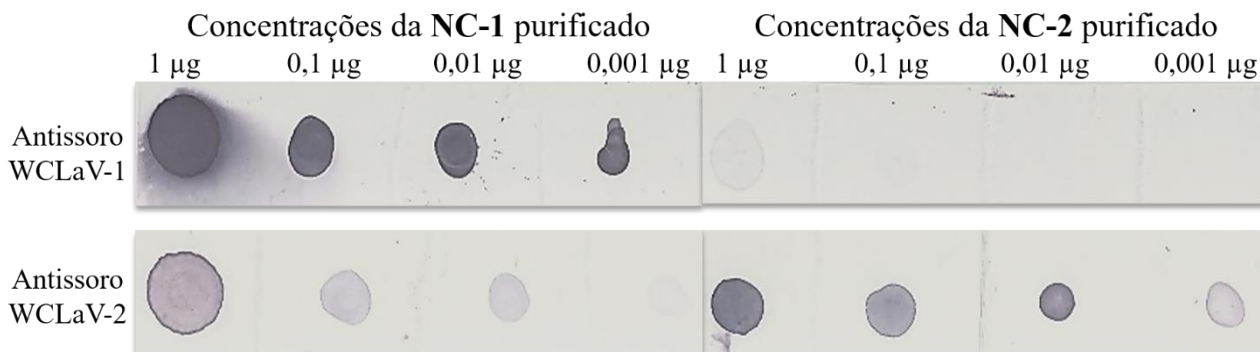


**Figura 8:** *Western blotting* (A) e coloração de prata de SDS-PAGE (B) com proteínas recombinantes do nucleocapsídeo purificada e parcial purificada de WCLaV-1 e WCLaV-2, respectivamente. O tamanho da proteína purificada é de aproximadamente 40 kDa. M: marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

### 3.4 Reatividade e sensibilidade de antissoros policlonais de WCLaV-1 e -2 em proteína expressa purificada e visualização de previsão de epítomos semelhantes entre WCLaV-1 e -2

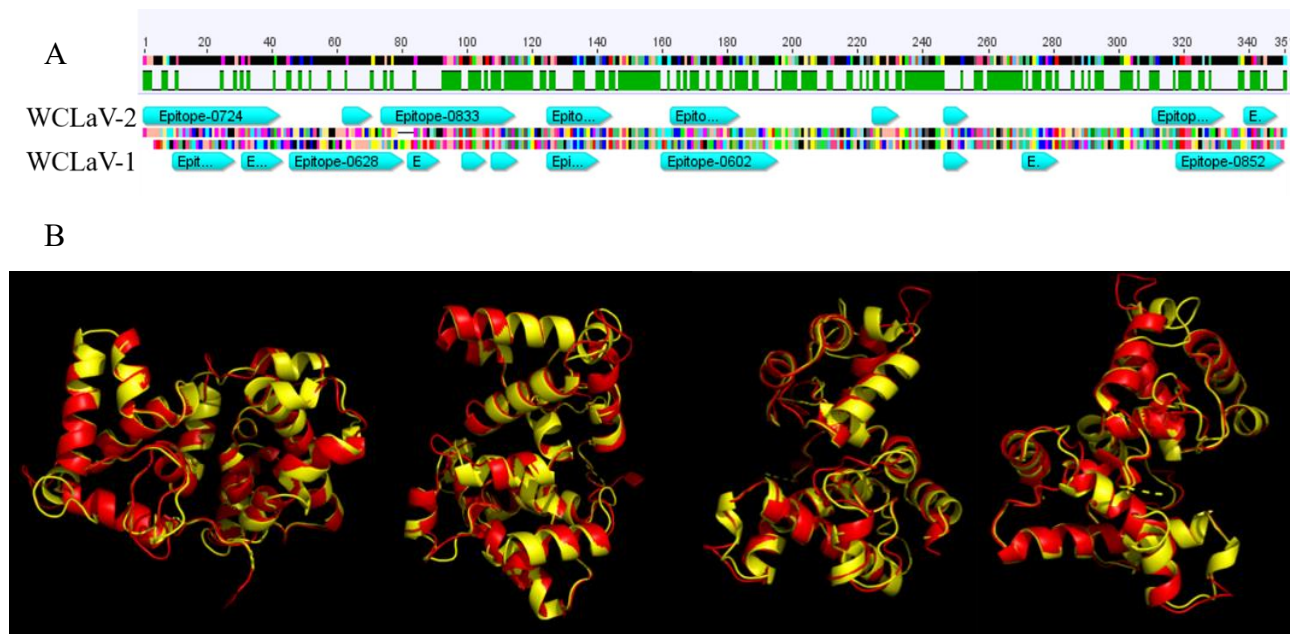
Para avaliar a reatividade e sensibilidade dos antissoros de WCLaV-1 e -2 produzidos, foi utilizado os antissoros provenientes da 1ª sangria confrontados com diferentes concentrações (1 µg; 0,1 µg; 0,01 µg; 0,001 µg) da NC expressa purificada de cada vírus, utilizando o método dot-ELISA. O resultado demonstra que os antissoros produzidos apresentam reatividade com todas as concentrações dos seus antígenos alvo (Fig. 9). Para o antissoro de WCLaV-2, notou-se reação

inespecífica com o antígeno purificado de WCLaV-1. Ambos os antissoros foram sensíveis para detectar os antígenos alvo.



**Figura 9:** Dot-ELISA para observação da reatividade e sensibilidade dos antissoros policlonais produzidos (antissoro WCLaV-1; antissoro WCLaV-2) para WCLaV-1(NC-1) e WCLaV-2 (NC-2). As amostras são as proteínas do nucleocapsídeo expressadas e purificadas de WCLaV-1 e -2 em diferentes concentrações (1 µg; 0,1 µg; 0,01 µg; 0,001 µg).

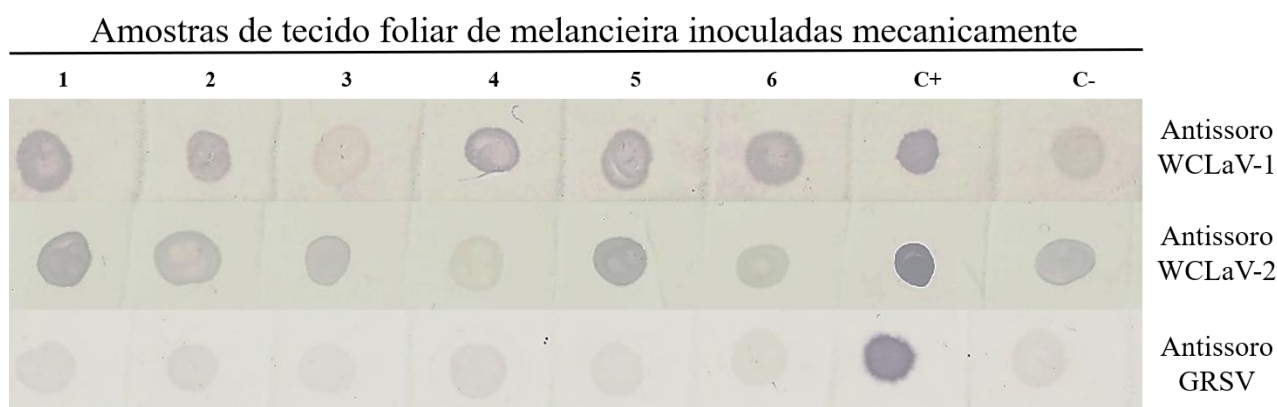
As previsões realizadas para epítomos presentes nas proteínas recombinantes indicou possível formação de epítomo semelhante entre WCLaV-1 e -2. A sobreposição dos epítomos em 3D foi realizado com o software PyMOL (Fig. 10).



**Figura 10:** (A) Alinhamentos de proteínas da NC de WCLaV-1 e -2; epítomos previstos pelo programa Ellipro podem ser observados em azul. (B) Alinhamento de estruturas 3D das regiões de alta probabilidade por Phyre2 de WCLaV-1 (em amarelo) e -2 (em vermelho). Estrutura desta região é altamente conservada mesmo com a identidade de aminoácidos baixa (59% de identidade).

### 3.5 Reatividade dos antissoros policlonais de WCLaV-1 e -2 utilizando plantas infectadas

Os antissoros policlonais produzidos foram testados utilizando o método dot-ELISA para plantas inoculadas mecanicamente. Após três semanas das plantas inoculadas, os extratos de tecidos foliar foram previamente fixados em membrana de nitrocelulose. Com isso, avaliou-se a reatividade dos antissoros produzidos. A adsorção cruzada é um processo opcional que filtra moléculas que podem se ligar de forma inespecífica com a imunoglobulina utilizada, assim a utilização de extrato de planta inicialmente no método dot-ELISA diminui a reatividade cruzada e aumenta a eficiência. O resultado demonstra que os antissoros apresentam eficiência para diferenciação (Fig. 11) dos agentes etiológicos para fins de detecção, como exemplo, a amostra 4 apresentou reação com antissoro de WCLaV-1 e não reagiu com antissoro de WCLaV-2, esse resultado é confirmado pela reação de RT-PCR (item 3.6). Além dos testes para identificação de WCLaV-1 e -2, as mesmas amostras foram testadas com antissoro para GRSV, que não foi detectado nas amostras testadas (Fig. 11), para garantir a eficiência dos antissoros produzidos.



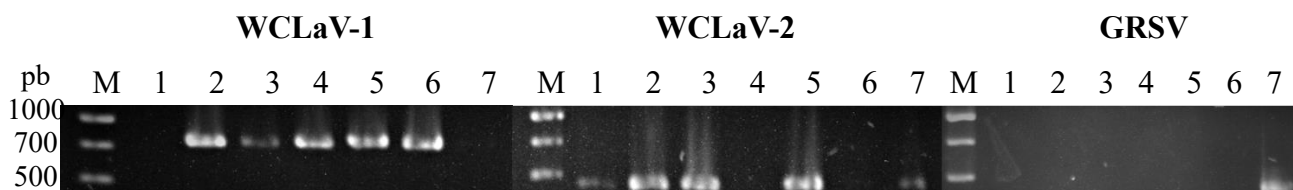
**Figura 11:** Dot-ELISA para avaliar reatividade de antissoros policlonais produzidos para WCLaV-1 e -2 com amostras de plantas infectadas. Amostras de folha de melanciaira que foram inoculadas mecanicamente a partir de isolados de campo (1-6); controle positivo de vírus semi-purificado (C+); controle negativo (C-).

### 3.6 RT-PCR de amostras testadas por Dot-ELISA

As amostras testadas por dot-ELISA tiveram resultados semelhantes quando comparadas com a reação de RT-PCR (Fig. 12). Os resultados obtidos confirmam a eficiência e sensibilidade dos antissoros e a passagem de WCLaV-1 e -2 mecanicamente. As amostras apresentaram ausência do



isolado de GRSV quando as plantas foram inoculadas mecanicamente, tanto por dot-ELISA quanto por RT-PCR, sendo amplificado somente o controle positivo (Fig. 12).



**Figura 12:** Gel de eletroforese dos produtos obtidos a partir de RT-PCR para detecção de GRSV, WCLaV-1 e -2. Amostras inoculadas mecanicamente com isolados de campo com infecção mista de GRSV, WCLaV-1 e -2 (1-6) e controle positivo (7). M: marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

O RT-PCR foi utilizado como método de comparação com o dot-ELISA, pois é um teste molecular sensível e acurado, com isso possibilita verificar o quanto os ensaios com dot-ELISA foram confiáveis, isso possibilitará ajustes para utilização de outras técnicas sorológicas para detecção. A comparação entre os métodos mostra que os antissoros policlonais produzidos são capazes de diferenciar os antígenos alvo presentes em plantas infectadas de campo. As amostras 4 e 6 (Tabela 3), evidenciam a afinidade dos antissoros produzidos quando testados com amostras de campo, sendo possível a diferenciação dos vírus, apesar do antissoro de WCLaV-2 ter pouca reação com antígeno expresso purificado de WCLaV-1 (item 3.4). As amostras 1 e 3 testadas (Tabela 3) para WCLaV-1 apresentam resultados divergentes, isso pode ter ocorrido devido a falhas na realização do teste.

**Tabela 3:** Comparação de interpretação de resultados obtidos por Dot-ELISA e RT-PCR

		WCLaV-1					
		1	2	3	4	5	6
<b>Dot-ELISA</b>		+	+	-	+	+	+
<b>RT-PCR</b>		-	+	+	+	+	+
		WCLaV-2					
		1	2	3	4	5	6
<b>Dot-ELISA</b>		+	+	+	-	+	-
<b>RT-PCR</b>		+	+	+	-	+	-

#### 4. DISCUSSÃO

Este trabalho trata da produção de antissoros para detecção de WCLaV-1 e -2, já que esses vírus foram relatados na China (Xin *et al.*, 2017), Estados Unidos (Hernandez *et al.*, 2021) e Brasil (Maeda *et al.*, 2021) em plantas de melancia. Além disso, isolados dos municípios de Mossoró e Juazeiro, sequenciados neste trabalho, mostraram a partir de análise filogenética que possuem identidade de 99% com isolados de referência de WCLaV-1 e -2. Os vírus WCLaV-1 e -2 foram relatados em infecções mistas com GRSV, já presente no Brasil (Leão *et al.*, 2015). Recentemente, a melancieira foi relatada na Argentina como nova hospedeira de GRSV (Pozzi *et al.*, 2021). Isso pode ser um alerta para a possibilidade da presença dos coguvirus em outras regiões do mundo, ainda não relatados. É importante haver o monitoramento desses vírus em plantios, assim os antissoros produzidos serão fundamentais para trabalhos epidemiológicos dessa doença, pois possibilitará avaliar a distribuição e incidência dos vírus em melancieiras e em outras culturas no país e no mundo, o potencial fitopatogênicos dos vírus não é conhecido, nem sua relação com outros vírus em infecções mistas.

Os vírus de RNA, de modo geral, apresentam disposição a erros de replicação do seu RNA (Domingo, 1994). Alguns fatores evolutivos como *Muller's ratchet* (Chao, 1997), seleção, deriva genética e *bottleneck effect* podem colaborar para redução da diversidade dentro de população viral (Lin *et al.*, 2004). Os estudos comparativos de sequências de NC dos isolados de WCLaV-1 e -2 da China, EUA e Brasil mostraram baixa frequência de mutações, indicativo forte, que este vírus tem o efeito de *bottleneck* recente. Alguns estudos mostram que *bottleneck* genético gera reduções severas no tamanho da população viral e que é presente no processo de colonização do seu hospedeiro e transmissão entre hospedeiros (Sacristán *et al.*, 2003; Betancourt *et al.*, 2008). Alguns insetos pode ser causadores de *bottleneck* para espécies virais, como os tripses para algumas espécies de orthospovirus (Zhao & Rosa, 2020).

Para a expressão dos antígenos desse trabalho foi realizada a clonagem no vetor de expressão PepRSV M3B (Tavares-Esashika, 2021). A clonagem foi realizada utilizando GA, esse método mostrou-se eficiente (Blawid & Nagata, 2015; Bodat *et al.*, 2015; Kalva *et al.*, 2018)., uma vez que, consiste em uma reação isotérmica com montagem de múltiplos fragmentos de DNA, gerando um produto final com total ligação, sem corte e lacunas. Existem diversas técnicas de expressão de proteínas recombinantes para diferentes fins, cada sistema irá apresentar suas peculiaridades como vantagens e desvantagens; a demanda atual é um sistema de expressão com eficiência, simples e de baixo custo (Lindbo, 2007). As proteínas heterólogas podem ser produzidas em diferentes organismos



desde procariotos, como bactérias até eucariotos, como mamíferos e plantas (Sørensen, 2010; Rybicki, 2014). A produção de antígenos a partir de proteína expressada em *E. coli*, é um sistema de baixo custo, mas apresenta desvantagens como a incapacidade dos procariotos em realizar modificações pós-tradução, produção de proteínas inativas com geração de corpos de inclusão e estrutura terciária em diferente maneira (Sahdev *et al.*, 2007). Sabe-se que algumas proteínas virais do tipo glicoproteína, necessitam de glicosilação e outras modificações no retículo endoplasmático (RE). O sistema de *E. coli* não é adequado quando se tem necessidade de produção destas proteínas em forma mais nativa. Este estudo, tem como objetivo produzir anticorpo para ser utilizado em diagnóstico de rotina com grande quantidade de amostras, com isso foi escolhido o sistema de expressão transiente do gene do nucleocapsídeo em plantas.

A utilização de plantas como biorreator é vantajoso, pois são organismos eucarióticos, conseguem expressar proteínas complexas e apresentam processos pós-traducional (Scotti & Cardi., 2012). Essas características são suficientes para expressão de proteínas heterólogas e, é facilitada devido as plantas serem hospedeiras naturais dos vírus estudados nesse trabalho. Para a expressão dos genes em plantas foi utilizada a estratégia de vetor viral PepRSV clonado em vetor binário pJL89 (Tavares-Esashika *et al.*, 2020), possibilitando a utilização de *Agrobacterium tumefaciens*, que transfere para a planta o DNA exógeno através de agroinfiltração (Gohlke & Deeken, 2014). A vantagem de usar vetores virais a partir de clones infecciosos de vírus vegetal é que possuem replicação e/ou transcrição eficientes em células vegetais, hospedeira natural (Cañizares *et al.*, 2005).

O modelo do vetor viral PepRSV escolhido para este trabalho, apresenta deleção total do gene de CP (Tavares-Esashika, 2021), geralmente não é prejudicial, uma vez que, a energia celular para a tradução da CP é utilizada na tradução da proteína de interesse (Lidbo, 2007). Além disso, o vetor tem região promotora 35S duplicado (Tavares-Esashika *et al.*, 2020), isso possibilita o aumento de mRNA, neste caso, RNA do vetor viral, com isso, possibilita-se maiores níveis de expressão. Assim, o sistema de expressão transiente dos genes do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 em plantas de *N. benthamiana* a partir de vetor viral PepRSV apresentou níveis de expressão suficientes e satisfatórios para a realização deste trabalho, já que se obteve quantidade de proteína recombinante suficiente para realização da imunização em coelhos.

O processo de purificação de uma proteína é fundamental para estudo de suas propriedades e estruturas, com o avanço das técnicas de purificação, tornou-se comum realizar adição de poucos ou muitos resíduos de aminoácidos em extremidades das proteínas (Nelson & Cox, 2014). Existem diferentes métodos de purificação de proteína em coluna, como a de troca iônica, exclusão por tamanho e por afinidade. As proteínas recombinantes, deste trabalho, foram fusionadas com His-Tag,

pois o anel aromático (imidazole) da histidina é o principal contribuinte para interação entre proteínas e íons metálicos, isso facilita o processo de purificação de proteína utilizando a cromatografia por afinidade ou IMAC (Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos) (Bresolin *et al.*, 2009). Vale ressaltar que a His-Tag é utilizada em vários sistemas de expressão para purificação de proteínas, incluindo leveduras, bactérias, plantas, insetos e células de mamíferos (Yadav *et al.*, 2016). No estudo, as proteínas de NC dos WCLaV-1 e -2 foram lavadas com concentração de imidazol 150 e 250 mM, respectivamente, que é uma condição altamente rigorosa, que resultou na alta pureza das proteínas purificadas, sendo suficientes para produzir anticorpo que tenham mínima reação cruzada quando imunizados em coelho. Os anticorpos produzidos mostraram baixa reatividade com planta sadia como esperado. Para reação cruzada pode ser reduzida realizando a absorção cruzada com extrato de planta sadia adicionando-o na purificação de anticorpo ou na hora da realização do Dot-ELISA.

Existem dois tipos principais de epítomos de uma proteína: os contínuos/lineares ou descontínuos/conformacionais. Os epítomos lineares são segmentos compostos por uma sequência contínua de resíduos ao longo da cadeia de aminoácidos. Os epítomos conformacionais, são constituídos por diversos segmentos sequencialmente descontínuos que são reunidos pela dobra do antígeno em sua estrutura nativa ou natural (Barlow *et al.*, 1986). No entanto, durante o processo de testes sorológicos, o anticorpo pode ligar-se a um antígeno não específico somente por possuir epítomos similares com o antígeno imunizador (Abbas *et al.*, 2012). Nesse caso, é possível haver a reação de anticorpos para antígenos não específicos sem haver exposição prévia, denominando-se reação cruzada (Gershwin, 1995; Abbas *et al.*, 2012). Os antissoros produzidos nesse trabalho foram eficientes e sensíveis, no entanto o antissoro de WCLaV-2 apresentou reatividade com o antígeno expresso purificado de WCLaV-1, apresentando pouca afinidade, isso pode ter ocorrido pelo reconhecimento de epítomos semelhantes entre o antígeno alvo e o antígeno não específico.

A hipótese de epítomos semelhantes foi testada usando o software ElliPro (Ponomarenko *et al.*, 2008). Os antígenos de WCLaV-1 e -2 utilizados neste trabalho apresentaram epítomo semelhante provável com score maior de 0,500. A visualização em 3D da estrutura do epítomo feito no software PyMOL (Fig.10) fortalece a hipótese da probabilidade do anticorpo para WCLaV-2 reagir com antígeno expresso purificado de WCLaV-1 por semelhança de epítomo.

A fragmentação do antígeno de WCLaV-2 a ser injetado pode ter levado a formação de mais de um tipo de epítomo, como epítomos lineares, reduzindo a afinidade e especificidade do antissoro produzido. Além disso, criptotipos podem ter sido expostos a partir da degradação no momento da imunização, esse sítio antigênico, geralmente, só é ativo após a dissociação de agregados de proteínas (Van Regenmortel, 2008), caso tenha havido geração de anticorpos para esse tipo de epítomo exposto

a afinidade do antissoro produzido pode ser reduzida, já que essa região naturalmente é interna e não ficando exposta para reação antígeno-anticorpo. Outra hipótese é que durante o processo de expressão transiente do gene de WCLaV-2 em plantas possa ter ocorrido *Splicing* alternativo, gerando mais de uma isoforma da proteína, caso tenham sido gerados anticorpos para ambas isoformas, a afinidade do antissoro do WCLaV-2 reduz e pode ter reação cruzada com antígeno expresso purificado de WCLaV-1. O inverso não ocorre para WCLaV-1, já que pode ser visualizado na fig. 8A, que não houve sinais de fragmentação da proteína recombinante.

## 5. CONCLUSÕES

O sistema de expressão transiente para o gene do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2 em plantas de *N. benthamiana* foi eficiente e poderá ser aplicado para situações semelhantes, como vírus em infecções mistas, vírus de baixa concentração na planta hospedeira;

O vetor PepRSV foi um vetor de expressão eficiente para as proteínas do nucleocapsídeo de WCLaV-1 e -2, já que a quantidade de proteína recombinante purificada foi suficiente para imunização em coelhos em pouco tempo;

O antissoro de WCLaV-2 apresentou reação cruzada com antígeno expresso purificado de WCLaV-1, no entanto não apresentou reação cruzada com plantas infectadas, sendo necessário testes de padronização de concentração de amostra e antissoro

Os antissoros produzidos de WCLaV-1 e -2 possibilitarão estudos de interação entre planta-patógeno-vetor, observação de partícula viral, sítio de replicação viral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª edição, 2012.
- AGRIOS GN. *Plant pathology*. 5th ed. Academic Press; Burlington, VT, USA: 2004. p. 922.
- AGUIAR, R. *et al.* Serological identification of virus in watermelon production fields in the Tocantins state. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 192-197, 2015.
- ALMEIDA, A. M. R. Noções de sorologia aplicadas à fitovirologia. **Embrapa Soja- Documentos (INFOTECA-E)**, 1995.
- BARLOW, D. J.; EDWARDS, M. S.; THORNTON, J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature**, v. 322, n. 6081, p. 747-748, 1986.
- BETANCOURT, M. *et al.* Estimation of the effective number of founders that initiate an infection after aphid transmission of a multipartite plant virus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 24, p. 12416-12421, 2008.
- BLAWID, R.; NAGATA, T. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. **Journal of Virological Methods**. v. 222, p. 11-15. 2015.
- BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1288-1296, 2009.
- BOARI, A. de J. *et al.* Doenças em hortaliças cultivadas na Região Metropolitana de Belém. Embrapa Amazônia Oriental-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2017.
- BODAT, A. *et al.* Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2015.
- BUCHER, E. *et al.* Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. **Journal of virology**, v. 77, n. 2, p. 1329- 1336, 2003.
- CAÑIZARES, M. C.; NICHOLSON, L.; LOMONOSSOFF, G. P. Use of viral vectors for vaccine production in plants. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 3, p. 263-270, 2005.
- CHAO, L. Evolution of sex and the molecular clock in RNA viruses. **Gene**, v. 205, n. 1-2, p. 301-308, 1997.
- CHAVES, P. P. N. *et al.* Caracterização físico-química e sensorial de famílias de melancia tipocrimson sweet selecionadas para reação de resistência a *potyvirus*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n.4, p. 120–125, 2013
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, n.3,

p. 475-483, 1977.

COLARICCIO A, *et al.* Proceedings of the Fourteenth IOCV Conference, 2000: Other Viruses. International Organization of Citrus Virologists (IOCV); Riverside, CA, USA: 2000. Preliminary purification and double stranded RNA analysis of citrus leprosis virus; pp. 159– 163.

DANIELL, H. *et al.* Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. **Trends in plant science**, v. 14, n. 12, p. 669-679, 2009.

DIAZ-LARA, A. *et al.* Two novel negative-sense RNA viruses infecting grapevine are members of a newly proposed genus within the family phenuiviridae. **Viruses**, v. 11, n. 8, p. 685, 2019.

DOMINGO, E. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. **The evolutionary biology of viruses**, p. 161-184, 1994.

EMBRAPA. Tecnologias para a produção de melancia irrigada na Baixada Maranhense. 2019. p. 9. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/>> Acesso em: 09 de agosto de 2021.

FAJARDO, T. V. M. *et al.* Expression of Grapevine leafroll-associated virus 3 coat protein gene in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.6, p. 496–500, 2007.

FAOSTAT/FAO. 2019. Divisão de Estatística da FAO/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Disponível em: <[www.fao.org/faostat/en/#data/QC](http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC)> Consultado em 15 de março de 2021.

GERSHWIN, L. J.; KRAKOWKA, S.; OLSEN, R. G. **Immunology and immunopathology of domestic animals** (No. Ed. 2). Mosby-Year Book, Inc. 1995.

GHARIB, M. *et al.* Artifactual sulfation of silver-stained proteins: implications for the assignment of phosphorylation and sulfation sites. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n.3, p. 506-518, 2009.

GIBSON, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.

GOHLKE, J.; DEEKEN, R. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 155, 2014.

HEFFERON, K. L. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. **Virology**, v. 433, n. 1, p. 1-6, 2012.

HERNANDEZ, R. N. *et al.* First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 (WCLaV-1) and WCLaV-2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) in the United States. **Plant Disease**, v. 0, p. 1, 2021.

HOOPER, P. L.; HIGHTOWER, L. E.; HOOPER, P. L. Loss of stress response as a consequence of viral infection: Implications for disease and therapy. **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n. 6, p.

647–655, 2012.

HULL R. Plant virology. Academic Press; London, UK: 2013. p. 1104

IBGE. 2019. Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia – Produção Agrícola Municipal. Disponível em: < cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/14/10340> Consultado em: 14 de março de 2021.

ICTV. 2020. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>. Acessado em: 19 de agosto de 2021.

KALVA, S. *et al.* Gibson Deletion: a novel application of isothermal in vitro recombination. **Biological Procedures online**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2018.

KITAJIMA, E. W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, v. 20, n. 2, p. 45, 2020.

KJEMTRUP, S. *et al.* Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. **The Plant Journal**, v. 14, n. 1, p. 91-100, 1998.

KRENEK, P. *et al.* Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1024-1042, 2015.

KUHN, J. H. *et al.* 2020 taxonomic update for phylum Negarnaviricota (Riboviria:Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. **Archives of Virology**, v. 165, p. 3029-3021, 2020.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. **The protein protocols handbook**, p. 17-24, 2009.

KUMAGAI, M. H. *et al.* Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derivedRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1679-1683, 1995.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874. 2016.

LAMBERT, R. A. *et al.* Mulching é uma opção para o aumento de produtividade da melancia. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 53–57. 2017.

LEÃO, E. U. *et al.* *Citrullus lanatus* is a new natural host of Groundnut ringspot virus in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 11-12, p. 1014-1018, 2015.

LIMA, M. F. Detecção e Controle de Viroses em Videira. **Circular Técnica online**, v. 1, n. 1, p. 9, 2009.

LIMA, M. F. Cultura da melancia. **Embrapa Hortaliças-Livro técnico (INFOTECA-E)**,2014.

LIN, H. X. *et al.* Molecular population genetics of Cucumber mosaic virus in California: evidence for founder effects and reassortment. **Journal of Virology**, v. 78, n. 12, p. 6666-6675,2004

LINDBO, J. A. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. **BMC Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2007

- LING, Kai-Shu et al. Effective application of DAS-ELISA for detection of grapevine leafroll associated closterovirus-3 using a polyclonal antiserum developed from recombinant coat protein. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 4, p. 301-309, 2000.
- MAEDA, M. H. K. et al. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and 2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) plants in Brazil. **Plant Disease**, 2021.
- NAGATA, T. *et al.* The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, v. 53, n. 2, p. 136–140, 2004.
- NAVARRO, B. *et al.* The first phlebo-like virus infecting plants: a case study on the adaptation of negative-stranded RNA viruses to new hosts. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 5, p. 1075–1089, 2018a.
- NAVARRO, B. *et al.* A negative-stranded RNA virus infecting citrus trees: The second member of a new genus within the order bunyavirales. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2340, 2018b.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-6**. Artmed Editora, 2014.
- NORKUNAS, K. *et al.* Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2018.
- OBEMBE, O. O. *et al.* Advances in plant molecular farming. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 210-222, 2011.
- PENNEY, C. A. *et al.* Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 5, p. 789-798, 2011.
- PONOMARENKO, J. *et al.* ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2008.
- POZZI, E. A. *et al.* *Citrullus lanatus*: A new natural host of groundnut ringspot orthotospovirus in Argentina. **AgriScientia**, v. 38, n. 1, p. 71–78. 2021.
- RAMOS, N. F.; LIMA, J. A. A.; GONÇALVES, M. F. B. Efeitos da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 199-203, 2003.
- RATCLIFF, F. *et al.* Technical advance: tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **The Plant Journal**, v. 25, n. 2, p. 237-245, 2001.
- RUIZ, M. T. *et al.* Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **The Plant Cell**, v. 10, n. 6, p. 937-946, 1998.
- RYBICKI, E. P. Plant-based vaccines against viruses. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2014.
- SACRISTÁN, S. *et al.* Estimation of population bottlenecks during systemic movement of Tobacco mosaic virus in tobacco plants. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 9906-9911, 2003.



SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, n. 1–2, p. 249–264, 2008.

SANTOS G.R. *et al.* Doenças fungicas, bacterianas e abióticas. In: SANTOS, G. R. dos; ZAMBOLIM, L. (Ed). Tecnologias para produção sustentável da melancia no Brasil. Gurupi: Universidade Federal do Tocantins, p. 95-150, 2011.

SCOTTI, N.; CARDI, T. Plastid transformation as an expression tool for plant-derived biopharmaceuticals. In: **Transgenic Plants**. Humana Press, p. 451-466, 2012.

SØRENSEN, H. P. Towards universal systems for recombinant gene expression. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 1-4, 2010.

SOUSA, V. F.; ZONTA, J. B.; NUNES, G. M. V. C. Análise econômica para a cultura da melancia irrigada na baixada maranhense. In: Congresso brasileiro de fruticultura, 26. 2019, Juazeiro, BA/Petrolina, PE. Fruticultura de precisão: desafios e oportunidades: anais. Juazeiro,BA/Petrolina, PE: SBF, 2019.

TAVARES-ESASHIKA, M. L. *et al.* Characterization of an infectious clone of pepper ringspotvirus and its use as a viral vector. **Archives of virology**, v. 165, n. 2, p. 367-375, 2020.

TAVARES-ESASHIKA, M. L. **Construção do clone infeccioso e vetor viral de pepper ringspot virus**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília. Brasília, 2021.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Antigenicity and Immunogenicity of Viral Proteins BT - Encyclopedia of Virology (Third Edition). **Encyclopedia of Virology (Third Edition)**, p. 137–142, 2008.

XIN, M. *et al.* Two negative-strand RNA viruses identified in watermelon represent a novel clade in the order Bunyavirales. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1514, 2017.

YADAV, D. K. *et al.* An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 612, p. 57-77, 2016.

ZHAO, K.; ROSA, C. Thrips as the transmission bottleneck for mixed infection of two orthospoviruses. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 509, 2020.

ZHANG, S. *et al.* Watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and watermelon crinkle leaf-associated virus 2 have a bipartite genome with molecular signatures typical of the members of the genus Coguvirus (family Phenuiviridae). **Archives of Virology**, v. 166, n. 10, p. 2829-2834, 2021.