



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE VÍRUS DA  
FAMÍLIA *POTYVIRIDAE* INFECTANDO LEGUMINOSAS  
FORRAGEIRAS NO BRASIL**

**JAMILE MENDES DE SOUZA**  
ORIENTADOR: RENATO DE OLIVEIRA RESENDE

BRASÍLIA – DF

2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE VÍRUS DA  
FAMÍLIA *POTYVIRIDAE* INFECTANDO LEGUMINOSAS  
FORRAGEIRAS NO BRASIL**

**JAMILE MENDES DE SOUZA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Molecular, do Departamento de Biologia  
Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília como requisito para a  
obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador: **Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende**

BRASÍLIA – DF

2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE VÍRUS DA  
FAMÍLIA *POTYVIRIDAE* INFECTANDO LEGUMINOSAS  
FORRAGEIRAS NO BRASIL**

**JAMILE MENDES DE SOUZA**

**CAPÍTULO 1:** REVISÃO DE LITERATURA

**CHAPTER 2:** TWO VIRUSES FROM *STYLOSANTHES GUIANENSIS* MAY REPRESENT A NEW GENUS WITHIN *POTYVIRIDAE*

**CHAPTER 3:** MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A NEW *ROYMOVIRUS* (*POTYVIRIDAE*) CO-INFECTING *STYLOSANTHES GUIANENSIS*

**CAPÍTULO 4:** ENSAIOS DE TRANSMISSÃO DOS STYLOVIRUSES COM MOSCA BRANCA E CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS VIRAIS

**CAPÍTULO 5:** ESTUDOS DAS INTERAÇÕES CELULARES ENTRE OS STYLOVIRUSES E HOSPEDEIRO VEGETAL (*NICOTIANA BENTHAMIANA*) POR EXPRESSÃO TRANSIENTE DE PROTEÍNAS VIRAIS EM ENSAIOS *IN VIVO*.

JAMILE MENDES DE SOUZA

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE VÍRUS DA  
FAMÍLIA *POTYVIRIDAE* INFECTANDO LEGUMINOSAS  
FORRAGEIRAS NO BRASIL**

**Banca Examinadora:**

---

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

---

**Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro**  
(CEL-UnB)

---

**Dr<sup>a</sup>. Marília Santos Silva**  
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

---

**Dr<sup>a</sup>. Mirtes Freitas Lima**  
(Embrapa Hortaliças)

---

**Dr<sup>a</sup>. Fernanda Rausch Fernandes (Suplente)**  
(Embrapa Agricultura Digital)



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

### FICHA CATALOGRÁFICA

De Souza, J. M.

**Estudos biológicos e moleculares de vírus da família *Potyviridae* infectando leguminosas forrageiras no Brasil.**

Jamile Mendes de Souza

Brasília, 2021

Número de páginas p.: 157

Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

- I- Gado de Corte, Mineirão, *Stylosanthes guianensis*, *Potyviridae*, stylovirose.
- II- Universidade de Brasília. PPG/BioMol.
- III- Estudos biológicos e moleculares de vírus da família *Potyviridae* infectando leguminosas forrageiras no Brasil.

*"Be less curious about people and more curious about ideas." (Marie Curie)*

*Ao meu pai **Paulo Luiz** (In memoriam) que foi e sempre será tão presente em minha  
educação, em meu coração e em minha vida...*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, autor de toda criação, meu maior incentivador e consolador. Só tenho o que agradecer o dom que Ele me Deus de fazer ciência, permitindo ser bióloga, capacitou-me e ajudou-me a vencer os desafios ao longo dessa jornada de pós-graduação. Obrigada Senhor!

À minha mãe Patrícia e minha irmã Louise por sempre estarmos unidas e é assim que temos superado muitos desafios e também compartilhado vitórias. Obrigada meninas!

Ao meu querido orientador Renato Resende, pela paciência, compreensão, sensatez, apoio e aprendizado. Aquele que fez muito mais do que me orientar, ele me acolheu e me ajudou em tempos difíceis! Obrigada por esses seis anos!

Ao meu namorado, amigo e companheiro João Lucas que eu conheci durante essa caminhada de pós-graduação e com quem pude dividir muitos momentos durante esse período. Que possamos continuar juntos e compartilhar tantos outros. Obrigada de coração!

Aos doutores Athos Silva de Oliveira e Fernando Lucas Melo pela parceria no decorrer do trabalho. Aprendi muito com vocês e serei sempre grata por todo apoio profissional que me deram e principalmente as contribuições para a publicação dos meus artigos. Obrigada!

Aos pesquisadores e colaboradores da Embrapa Gado de Corte, em especial: Celso Dornellas Fernandes, José Raul Valério e Fabrícia Zimmermann Vilela Torres. Às pesquisadoras da Embrapa Cenargem: Marília Silva e Simone Ribeiro. Ao pesquisador da Embrapa Cerrados Rodrigo Fragoso. Obrigada pela parceria no decorrer desse projeto!

Aos colaboradores, parceiros e amigos que fiz no decorrer dessa caminhada na UnB: Anna Sofya, Luciane Reis, Ikaro Andrade, Jéssica Silva, Anelise Franco, Karina Silva, Rayane Nunes, Anna Fernanda, Brenda Rabello, Leonardo de Assis, Fabrício Morgado, Daniela Castilho e Karen Paiva. Muito obrigada pessoal!

Ao corpo docente dos programas de pós-graduação em Biologia Molecular, em especial aos professores, Tatsuya Nagata, Bergmann Ribeiro, Anamélia Bocca, Raimundo Corrêa, Sônia Bão, Lídia Pepe, Fernando Araripe, Werner Treptow e Vicente de Paulo, sou muito grata por todo aprendizado, disponibilidade e apoio. Gratidão!

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Fitopatologia, em especial aos professores Rita de Cássia Pereira, Cláudio Lúcio Costa e Marisa Ferreira, mesmo após minha migração da Fitopatologia (mestrado) para a Biologia Molecular (doutorado) continuei encontrando apoio técnico-científico no departamento de Fitopatologia, obrigada por tudo!

Agradeço também à banca examinadora, em especial às doutoras Fernanda Rausch e Mirtes Lima que sempre me incentivaram e me inspiraram desde os tempos de estagiária na Embrapa Hortaliças. Muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília (PPG-BioMol).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo incentivo financeiro para realização do projeto Forrageiras.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	1
LISTA DE TABELAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	9
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO GERAL .....	14
JUSTIFICATIVA .....	16
OBJETIVO GERAL .....	17
OBJETIVO ESPECÍFICO .....	17
HIPÓTESE CIENTÍFICA .....	17
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1 A importância da carne bovina e do cultivo de forrageiras no Brasil.....	18
1.2 O consórcio entre gramíneas e leguminosas forrageiras.....	19
1.3 Leguminosas do gênero <i>Stylosanthes</i> spp. ....	20
1.4 Doenças nas pastagens, com foco em estilósantes.....	22
1.5 Família <i>Potyviridae</i> .....	23
1.5.1 Organização genômica da família <i>Potyviridae</i> .....	23
1.5.2 Eventos de recombinação .....	28
1.5.3 A ação das proteases e os sítios de clivagem .....	29
1.5.4 Funções das proteínas dos potyvirus dentro do ciclo de infecção .....	32
1.5.5 Ciclo de infecção: replicação e movimento viral .....	36
1.5.6 Mecanismo de supressão do silenciamento gênico .....	37
1.5.7 Transmissão e vetores .....	38
1.5.8 Sintomatologia, diagnose e controle de potyvirus .....	40
REFERÊNCIAS .....	43
CHAPTER 2: TWO VIRUSES FROM <i>STYLOSANTHES GUIANENSIS</i> MAY REPRESENT A NEW GENUS WITHIN <i>POTYVIRYDAE</i> .....	58
ABSTRACT .....	59
SHORT COMMUNICATION .....	60
FUNDING .....	66
SUPPLEMENTARY DATA- 1 .....	67
SUPPLEMENTARY DATA- 2 .....	68
REFERENCES .....	69
CHAPTER 3: MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A NEW <i>ROYMOVIRUS</i> ( <i>POTYVIRIDAE</i> ) CO-INFECTING THE FORAGE LEGUME <i>STYLOSANTHES GUIANENSIS</i> .....	73
ABSTRACT .....	74
SHORT COMMUNICATION.....	75
FUNDING .....	83
SUPPLEMENTARY DATA- 1 .....	85
SUPPLEMENTARY DATA- 2 .....	86

REFERENCES .....	87
------------------	----

CAPÍTULO 4: ENSAIOS DE TRANSMISSÃO DOS STYLOVIRUSES COM MOSCA BRANCA E CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS VIRAIS .....	92
--	----

RESUMO .....	92
--------------	----

ABSTRACT .....	93
----------------	----

4.1 INTRODUÇÃO .....	94
----------------------	----

4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	96
------------------------------	----

4.2.1 Ensaio de transmissão com mosca branca na Embrapa CNPGC.....	96
--	----

4.2.2 Inoculação mecânica em <i>Stylosanthes guianensis</i> cvs. Mineirão e Bela .....	99
--	----

4.2.3 Ensaio de transmissão com mosca branca na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (EEB- UnB) .....	100
---	-----

4.2.4 Produção de antissoro policlonal a partir do gene da capa proteica (CP) dos "styloviruses" .....	102
--	-----

4.2.5 Construção de vetores para expressão heteróloga em <i>E. coli</i> SHuttle a partir do gene da CP dos "styloviruses" para produção de antissoro policlonal .....	102
---	-----

4.2.6 Expressão e purificação das proteínas CPs dos "Styloviruses".....	104
---	-----

4.2.7 Análises dos transformantes de <i>E. coli</i> por Western Blotting .....	106
--	-----

4.2.8 Construção de vetores para expressão heteróloga em <i>K. phaffii</i> GS115 a partir do gene da CP dos "styloviruses" para produção de antissoro policlonal .....	106
--	-----

4.3 RESULTADOS .....	109
----------------------	-----

4.3.1 Ensaio de transmissão com mosca branca na Embrapa CNPGC .....	110
---	-----

4.3.2 Inoculação mecânica em <i>Stylosanthes guianensis</i> cvs Mineirão e Bela .....	111
---	-----

4.3.3 Ensaio de transmissão com mosca branca na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (EEB- UnB) .....	112
---	-----

4.3.4 Produção de antissoro policlonal a partir do gene da capa proteica (CP) dos "styloviruses" .....	114
--	-----

4.3.5 Análises da construção de vetores para expressão heteróloga em <i>E. coli</i> SHuttle a partir do gene da CP dos "styloviruses" para produção de antissoro policlonal .....	114
---	-----

4.3.6 Expressão e purificação das proteínas CP dos "styloviruses" .....	115
---	-----

4.3.7 Análises dos transformantes de <i>E. coli</i> por Western Blotting .....	115
--	-----

4.3.8 Análises da construção de vetores para expressão heteróloga em <i>K. phaffii</i> GS115 a partir do gene da CP dos "styloviruses" para produção de antissoro policlonal .....	116
--	-----

4.4 DISCUSSÃO .....	117
---------------------	-----

4.5 CONCLUSÃO .....	118
---------------------	-----

REFERÊNCIAS .....	120
-------------------	-----

CAPÍTULO 5: ESTUDOS DAS INTERAÇÕES CELULARES ENTRE OS STYLOVIRUSES E HOSPEDEIRO VEGETAL ( <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> ) POR EXPRESSÃO TRANSIENTE DE PROTEÍNAS VIRAIS EM ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	124
---	-----

RESUMO .....	124
--------------	-----

ABSTRACT .....	125
----------------	-----

5.1 INTRODUÇÃO .....	126
----------------------	-----

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	128
-------------------------------	-----

5.2.1 Amplificação dos genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV por RT-PCR para os ensaios de recombinação .....	128
5.2.2 Clonagem dos genes no vetor de entrada pDONR207 para reação de recombinação da BP Clonase .....	131
5.2.3 Clonagem dos recombinantes em pDONR207 nos vetores de destino pK7FWG2 e pK7WGF2 para a reação de LR Clonase .....	131
5.2.4 Transformação dos recombinantes em <i>A. tumefaciens</i> e agroinfiltração em <i>N. benthamiana</i> .....	133
5.2.5 Localização citoplasmática das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP em microscopia confocal .....	133
5.3 RESULTADOS .....	133
5.3.1 Amplificação dos genes P1-Pro, Hc-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV por RT-PCR para os ensaios de recombinação .....	134
5.3.2 Análise da clonagem dos genes no vetor de entrada pDONR207 para reação de BP Clonase .....	134
5.3.3 Análise da clonagem dos recombinantes em pDONR207 nos vetores de destino pK7FWG2 e pK7WGF2 para reação de LR Clonase .....	135
5.3.4 Transformação dos recombinantes em <i>A. tumefaciens</i> e agroinfiltração em <i>N. benthamiana</i> .....	136
5.3.5 Localização citoplasmática das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP em microscopia confocal .....	136
5.4 DISCUSSÃO .....	140
5.5 CONCLUSÃO .....	142
REFERÊNCIAS .....	144
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....	147
ANEXO I: PROTOCOLOS .....	149

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.1:** *Stylosanthes* spp. em campo experimental da Embrapa Gado de Corte (março de 2014). Foto: Silvia Rahe Pereira- CNPGC (pg. 20).

**Figura 1.2:** Cultivares comerciais. *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (A), *Stylosanthes guianensis* cv. Campo Grande (B) e *Stylosanthes guianensis* cv. Bela (C) em campo experimental. In: <https://www.mfrural>; <https://www.cearasementes>; <https://www.embrapa.org> (pg. 21)

**Figura 1.3:** Esquema da partícula viral de membros da família *Potyviridae*. Partícula alongada e flexuosa com simetria helicoidal. Proteína do capsídeo (CP) envolvendo todo o RNA genômico (em azul) (pg. 23).

**Figura 1.4:** Poliproteína característica dos gêneros monopartidos da família *Potyviridae*. O genoma monopartido medindo entre 8-11 kb. Em preto uma pequena ORF denominada PIPO, sobrepõe-se uma região de codificação da poliproteína (pg. 24).

**Figura 1.5:** Organização genômica dos gêneros monopartidos da família *Potyviridae*. Poliproteína com nove sítios de clivagem representados pelas setas coloridas, em que a seta verde representa o sítio da protease P1-Pro, a seta marrom o sítio de HC-Pro e a seta azul os sítios de NIa-Pro. Todos darão origem às dez proteínas multifuncionais. Na extremidade 3'UTR tem uma cauda poliA e na extremidade 5'UTR possui uma proteína ligada ao genoma, a VPg. Em preto abaixo da P3, a ORF PIPO (pg. 24).

**Figura 1.6:** Organização genômica da espécie tipo *Barley yellow mosaic virus* do gênero *Bymovirus*. Genoma bipartido com duas poliproteínas que se autoclivam dando origem a 10 proteínas funcionais. Poliproteína do RNA1 com 7 sítios de clivagem da protease NIa-Pro, representados pela seta azul e a poliproteína do RNA2 com um sítio de clivagem da protease P1-Pro representado pela seta verde. Nas extremidades 3'UTR têm uma cauda poliA e nas extremidades 5'UTR, há uma proteína ligada ao genoma, a VPg. Em preto abaixo da P3, a PIPO (pg. 25).

**Figura 1.7:** Representação esquemática de algumas variações genômicas entre os gêneros monopartidos da família *Potyviridae*. A) Organização genômica dos gêneros *Celavirus*, *Potyvirus*, *Poacevirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*. B) Organização genômica de um *Brambyvirus* em que a P1-Pro é maior do que o normal devido a presença do domínio AlkB. C) Organização genômica do gênero *Ipomovirus* onde há três diferenças entre espécies desse gênero: Ca) Organização genômica das espécies *Sweet potato mild mottle virus* e *Tomato mild mottle virus* assim como dos gêneros em A). Cb) Organização genômica das espécies *Squash vein yellowing virus* e *Cucumber vein yellowing virus* onde é possível ver a P1 dividida em duas (P1a e P1b) e a ausência da HC-Pro. Cc) Organização genômica das espécies *Cassava brown streak virus* e *Uganda cassava brown streak virus* com a HC-Pro ausente e um domínio HAM1h entre as proteínas NIb e CP. D) Organização genômica dos *Macluravirus* e *Bevemovirus* em que é possível perceber a ausência da proteína P1-Pro e presença de duas outras proteínas 7K e 9K. E) Organização genômica de um grupo monofilético dentro do gênero *Potyvirus* composto pelas espécies *Sweet potato feathery mottle virus*, *Sweet potato virus C*, *Sweet potato virus G*, *Sweet potato virus 2* e *Sweet potato latent virus* onde é possível ver a presença de uma terceira ORF a PISPO (pg. 27).

**Figura 1.8: Representação esquemática do ciclo de infecção viral na célula hospedeira- replicação e movimento virais.** O vírus entra na célula hospedeira, ocorre a desencapsidação e o RNA genômico é traduzido pelo ribossomo da hospedeira. Os potyvirus montam seus complexos de replicação (VRCs) e as vesículas virais são transportadas ao longo de filamentos de actina em direção a parede celular e ao plasmodesma (PD). Nas fases posteriores da infecção, as vesículas se fundem com membranas dos cloroplastos formando

estruturas perinucleares e as proteínas CI, VPg, CP e P3N-PIPO, participam do movimento célula-célula (pg. 37).

**Figure 1 (Chapter 2):** Leaves of *S. guianensis* cv. Mineirão showing virus-like mosaic and chlorotic spots symptoms (pg. 61).

**Figure 2 (Chapter 2): Genomic organization of new stylo-infecting viruses and their genetic relationship with other potyvirids.** (A) Annotation of StyMaV-1 and StyMaV-2 genomes. The numbers above the schemes indicate the position of nucleotides. The amino acids of cleavage sites are indicated below the schemes. The black rectangles represent PIPO ORF with the respective conserved motif. (B) Phylogenetic tree based on aa sequences of potyvirus polyproteins. Viruses with no genus are unassigned. (C) Pairwise alignment matrices of CP and polyproteins aa sequences from viruses classified in different genera of the family *Potyviridae*. Color scale from bright blue to intense red indicates from lowest to highest (100%) identity values, respectively. Names of genera and viruses used in these analyses: *Bymovirus*, barley yellow mosaic virus (RNA 1), BaYMV, NC\_002990; *Bymovirus*, barley mild mottle virus (RNA 1), BaMMV, NC\_003483; *Bymovirus*, oat mosaic virus (RNA 1), OMV, NC\_004016; *Macluravirus*, chinese yam necrotic mosaic virus, ChYNMV, NC\_018455; *Macluravirus*, artichoke latent virus, ArLV, NC\_026759; *Bevemovirus*, bellflower veinal mottle virus, BVMoV, NC\_039002; *Arepavirus*, areca palm necrotic spindle-spot virus, ANSSV, NC\_040836; *Celavirus*, celery latent virus, CeLV, MH932227; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, MK965971; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, MK965972; *Brambyvirus*, blackberry virus Y, BVY, NC\_008558; *Potyvirus*, tobacco etch virus, TEV, NC\_001555; *Potyvirus*, potato virus Y, PVY, NC\_001616; *Potyvirus*, soybean mosaic virus, SMV, NC\_002634; *Potyvirus*, bean common mosaic virus, BCMV, NC\_003397; *Potyvirus*, hardenbergia mosaic virus, HarMV, NC\_015394; *Rymovirus*, agropyron mosaic virus, AgMV, NC\_005903; *Rymovirus*, hordeum mosaic virus, HorMV, NC\_005904; *Rymovirus*, ryegrass mosaic virus, RgMV, NC\_001814; Unassigned, reed chlorotic stripe virus, CRCSV, NC\_035461; *Roymovirus*, rose yellow mosaic virus, RoYMV, NC\_019031; *Ipomovirus*, squash vein yellowing virus, SqVYV, NC\_010521; *Ipomovirus*, cassava brown streak virus, CBSV, NC\_012698; *Ipomovirus*, sweet potato mild mottle virus, SPMoV, NC\_003797; *Poacevirus*, triticum mosaic virus, TriMV, NC\_012799; *Poacevirus*, sugarcane streak mosaic virus, SCSMV, NC\_014037; *Poacevirus*, Caladenia virus A, CalVA, NC\_018572; *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, WSMV, NC\_001886; *Tritimovirus*, wheat eglid mosaic virus, WEqMV, NC\_009805; *Tritimovirus*, brome streak mosaic virus, BSMV, NC\_003501; Unassigned, Logan witches broom-associated virus, LWBaV, NC\_034835 (pg. 65).

**Figure S.1 (Chapter 2): Genomic organization of new stylo-infecting viruses and their genetic relationship with other potyvirids.** (A) Annotation of StyMaV-1 and StyMaV-2 genomes. The numbers above the schemes indicate the position of nucleotides. The amino acids of cleavage sites are indicated below the schemes. The black rectangles represent PIPO ORF with the respective conserved motif. (B) Phylogenetic tree based on nt sequences of potyvirus polyproteins. Viruses with no genus are unassigned. (C) Pairwise alignment matrices of CP nt and full genome sequences from viruses classified in different genera of the family *Potyviridae*. Color scale from bright blue to intense red indicates from lowest to highest (100%) identity values, respectively. Names of genera and viruses used in these analyses: *Bymovirus*, barley yellow mosaic virus (RNA 1), BaYMV, NC\_002990; *Bymovirus*, barley mild mottle virus (RNA 1), BaMMV, NC\_003483; *Bymovirus*, oat mosaic virus (RNA 1), OMV, NC\_004016; *Macluravirus*, chinese yam necrotic mosaic virus, ChYNMV, NC\_018455; *Macluravirus*, artichoke latent virus, ArLV, NC\_026759; *Bevemovirus*, bellflower veinal mottle virus, BVMoV, NC\_039002; *Arepavirus*, areca palm necrotic spindle-spot virus, ANSSV, NC\_040836; *Celavirus*, celery latent virus, CeLV, MH932227; ‘*Stylomovirus*’, stylo

mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, MK965971; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, MK965972; *Brambyvirus*, blackberry virus Y, BVY, NC\_008558; *Potyvirus*, tobacco etch virus, TEV, NC\_001555; *Potyvirus*, potato virus Y, PVY, NC\_001616; *Potyvirus*, soybean mosaic virus, SMV, NC\_002634; *Potyvirus*, bean common mosaic virus, BCMV, NC\_003397; *Potyvirus*, hardenbergia mosaic virus, HarMV, NC\_015394; *Rymovirus*, agropyron mosaic virus, AgMV, NC\_005903; *Rymovirus*, hordeum mosaic virus, HorMV, NC\_005904; *Rymovirus*, ryegrass mosaic virus, RgMV, NC\_001814; Unassigned, reed chlorotic stripe virus, CRCSV, NC\_035461; *Roymovirus*, rose yellow mosaic virus, RoYMV, NC\_019031; *Ipomovirus*, squash vein yellowing virus, SqVYV, NC\_010521; *Ipomovirus*, cassava brown streak virus, CBSV, NC\_012698; *Ipomovirus*, sweet potato mild mottle virus, SPMMV, NC\_003797; *Poacevirus*, triticum mosaic virus, TriMV, NC\_012799; *Poacevirus*, sugarcane streak mosaic virus, SCSMV, NC\_014037; *Poacevirus*, Caladenia virus A, CalVA, NC\_018572; *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, WSMV, NC\_001886; *Tritimovirus*, wheat eglid mosaic virus, WEqMV, NC\_009805; *Tritimovirus*, brome streak mosaic virus, BSMV, NC\_003501; Unassigned, Logan witches broom-associated virus, LWBaV, NC\_034835 (pg. 67).

**Figure 1 (Chapter 3):** Leaves of *S. guianensis* cv. Mineirão showing virus-like yellow mosaic and chlorotic leaf spots symptoms in the experimental field (pg. 76).

**Figure 2 (Chapter 3): Genomic organization of new stylo-infecting viruses and their genetic relationship with other potyvirids.** (A) Annotation of StyYMV genome. The numbers above the schemes indicate the position of nucleotides. The amino acids of cleavage sites are indicated below the schemes. The black rectangles represent PIPO ORF with the respective conserved motif. (B) Phylogenetic tree based on nt sequences of potyvirid full genomes. Viruses with no genus are unassigned. (C) Pairwise alignment matrices of capsid protein (CP) nt and full genome (FG) sequences from viruses classified in different genera of the family *Potyviridae*. Color scale from bright blue to intense red indicates from lowest to highest (100%) identity values, respectively. Names of genera and viruses used in these analyses: *Bymovirus*, barley yellow mosaic virus (RNA 1), BaYMV, NC\_002990; *Bymovirus*, barley mild mottle virus (RNA 1), BaMMV, NC\_003483; *Bymovirus*, oat mosaic virus (RNA 1), OMV, NC\_004016; *Macluravirus*, chinese yam necrotic mosaic virus, ChYNMV, NC\_018455; *Macluravirus*, artichoke latent virus, ArLV, NC\_026759; *Macluravirus*, yam chlorotic necrotic mosaic virus, NC\_038561; *Bevemovirus*, bellflower veinal mottle virus, BVMoV, NC\_039002; *Arepavirus*, areca palm necrotic spindle-spot virus, ANSSV, NC\_040836; *Celavirus*, celery latent virus, CeLV, NC\_055507; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, MK965971; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, MK965972; *Brambyvirus*, blackberry virus Y, BVY, NC\_008558; *Potyvirus*, potato virus Y, PVY, NC\_001616; *Potyvirus*, soybean mosaic virus, SMV, NC\_002634; *Potyvirus*, bean common mosaic virus, BCMV, NC\_003397; *Rymovirus*, agropyron mosaic virus, AgMV, NC\_005903; *Rymovirus*, hordeum mosaic virus, HorMV, NC\_005904; *Rymovirus*, ryegrass mosaic virus, RgMV, NC\_001814; Unassigned, reed chlorotic stripe virus, CRCSV, NC\_035461; Unassigned, spartina mottle virus, SpMV, MN788417; *Roymovirus*, rose yellow mosaic virus, RoYMV, NC\_019031; *Roymovirus*, passiflora edulis symptomless virus, PeSV, NC\_055497; *Ipomovirus*, squash vein yellowing virus, SqVYV, NC\_010521; *Ipomovirus*, cassava brown streak virus, CBSV, NC\_012698; *Ipomovirus*, sweet potato mild mottle virus, SPMMV, NC\_003797; *Poacevirus*, triticum mosaic virus, TriMV, NC\_012799; *Poacevirus*, sugarcane streak mosaic virus, SCSMV, NC\_014037; *Poacevirus*, Caladenia virus A, CalVA, NC\_018572; *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, WSMV, NC\_001886; *Tritimovirus*, wheat eglid mosaic virus, WEqMV, NC\_009805; *Tritimovirus*, brome streak mosaic virus, BSMV, NC\_003501; Unassigned, Logan witches broom-associated virus, LWBaV, NC\_034835 (pg. 80).

**Figure 3 (Chapter 3): All samples were collected in greenhouse after mechanic inoculation and the first symptoms were observed 15 dpi.** A) At right, *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão showing typical virus-induced yellow mosaic and chlorotic leaf spots symptoms. At left, negative control of *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão B) At right, *Stylosanthes guianensis* cv. Bela showing typical virus-induced yellow mosaic and chlorotic leaf spots symptoms. At left, negative control of *Stylosanthes guianensis* cv. Bela C) At right *Nicotiana tabaccum* presented leaf wrinkle and chlorosis. At left the negative control D) At right *Nicotiana rustica* presented leaf wrinkle. At left the negative control E) At right *Nicotiana benthamiana* presented mosaic and leaf wrinkle. At left the negative control. F) *Vigna unguiculata* G) *Phaseolus vulgaris* cv. BRS Pérola H) *Phaseolus vulgaris* cv. BRS Campeiro. All beans (F, G and H) presented leaf deformation (pg. 82).

**Figure S1 (Chapter 3): Genomic organization of new stylo-infecting viruses and their genetic relationship with other potyvirids.** (A) Annotation of StyYMV genome. The numbers above the schemes indicate the position of nucleotides. The amino acids of cleavage sites are indicated below the schemes. The black rectangles represent PIPO ORF with the respective conserved motif. (B) Phylogenetic tree based on aa sequences of potyvirus polyproteins. Viruses with no genus are unassigned. (C) Pairwise alignment matrices of capsid protein (CP) aa and polyprotein (ORF) sequences from viruses classified in different genera of the family *Potyviridae*. Color scale from bright blue to intense red indicates from lowest to highest (100%) identity values, respectively. Names of genera and viruses used in these analyses: *Bymovirus*, barley yellow mosaic virus (RNA 1), BaYMV, NC\_002990; *Bymovirus*, barley mild mottle virus (RNA 1), BaMMV, NC\_003483; *Bymovirus*, oat mosaic virus (RNA 1), OMV, NC\_004016; *Macluravirus*, chinese yam necrotic mosaic virus, ChYNMV, NC\_018455; *Macluravirus*, artichoke latent virus, ArLV, NC\_026759; *Macluravirus*, yam chlorotic necrotic mosaic virus, NC\_038561; *Bevemovirus*, bellflower veinal mottle virus, BVMoV, NC\_039002; *Arepavirus*, areca palm necrotic spindle-spot virus, ANSSV, NC\_040836; *Celavirus*, celery latent virus, CeLV, NC\_055507; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, MK965971; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, MK965972; *Brambyvirus*, blackberry virus Y, BVY, NC\_008558; *Potyvirus*, potato virus Y, PVY, NC\_001616; *Potyvirus*, soybean mosaic virus, SMV, NC\_002634; *Potyvirus*, bean common mosaic virus, BCMV, NC\_003397; *Rymovirus*, agropyron mosaic virus, AgMV, NC\_005903; *Rymovirus*, hordeum mosaic virus, HorMV, NC\_005904; *Rymovirus*, ryegrass mosaic virus, RgMV, NC\_001814; Unassigned, reed chlorotic stripe virus, CRCSV, NC\_035461; Unassigned, spartina mottle virus, SpMV, MN788417; *Roymovirus*, rose yellow mosaic virus, RoYMV, NC\_019031; *Roymovirus*, passiflora edulis symptomless virus, PeSV, NC\_055497; *Ipomovirus*, squash vein yellowing virus, SqVYV, NC\_010521; *Ipomovirus*, cassava brown streak virus, CBSV, NC\_012698; *Ipomovirus*, sweet potato mild mottle virus, SPMMV, NC\_003797; *Poacevirus*, triticum mosaic virus, TriMV, NC\_012799; *Poacevirus*, sugarcane streak mosaic virus, SCSMV, NC\_014037; *Poacevirus*, Caladenia virus A, CalVA, NC\_018572; *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, WSMV, NC\_001886; *Tritimovirus*, wheat eqlid mosaic virus, WEqMV, NC\_009805; *Tritimovirus*, brome streak mosaic virus, BSMV, NC\_003501; Unassigned, Logan witches broom-associated virus, LWBaV, NC\_034835 (pg. 86).

**Figura 4.1:** Sintomas virais em amostras de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão. Sintomas de mosaico intenso foram observados no acesso GC 984 do campo experimental da Embrapa Gado de Corte- MS (Mato Grosso do Sul) em que as moscas brancas foram coletadas para o ensaio de transmissão (pg. 97).

**Figura 4.2:** Plantas de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão mantidas em casa de vegetação da Embrapa Gado de Corte-MS em vasos de 1L protegidas por tela anti-mosca (pg. 98).

**Figura 4.3:** Representação esquemática do mapa do vetor pGEM T Easy *Promega*. Na figura é possível ver os múltiplos sítios de restrição de enzimas, a marca de seleção pelo antibiótico Ampicilina e o tamanho do vetor que possui 3015pb. Disponível em: <https://www.promega.com.br/en/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/> (pg. 99).

**Figura 4.4:** Plantas de *Stylosanthes guianensis* cvs. Mineirão (M) e Bela (B) inoculadas mecanicamente, com extrato vegetal das amostras GC 22 e GC 23 contendo os vírus StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV, após 15 dias de semeadura (pg. 99).

**Figura 4.5:** A) Criação de moscas brancas em plantas de repolho da casa de vegetação na Estação Experimental de Biologia da UnB. B) Middle East-Asia Minor 1 (MEAM 1) em diferentes instares colonizando folhas de repolho (pg. 100).

**Figura 4.6:** A) Isolado 3A de estilosantes cv. Mineirão colocado em gaiola individual tipo “clip cage”. O mesmo foi feito com os demais isolados (2D, 3C, 8A e 8C). B) Uma das três plantas usadas como controle de estilosantes cv. Mineirão colocada em gaiola individual assim como foi feito com os isolados em “A”. C) Plantas de estilosantes cvs. Mineirão e Bela inseridas nas gaiolas contendo moscas após o processo de aquisição para posterior transmissão. D) Plantas com moscas mantidas nas gaiolas durante o ensaio de transmissão que durou 45 dias (pg. 101).

**Figura 4.7:** Representação esquemática do mapa do vetor pET 28a *Novagene*. Na figura é possível ver os múltiplos sítios de restrição de enzimas, da marca de seleção pelo antibiótico canamicina e o tamanho do vetor que possui 5369pb. Disponível em: <https://pt.scribd.com/doc/91910066/pET-28a-c> (pg. 103).

**Figura 4.8:** Representação esquemática do vetor pPIC9 *Invitrogen*. Na figura é possível ver o promotor do gene AOX 1 de *K. phaffii* (5'AOX 1), o peptídeo sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* (S), o terminador de transcrição do gene AOX 1 de *K. phaffii*, a origem de replicação de *E. coli* (COLE1), a marca de seleção pelo antibiótico Ampicilina e múltiplos sítios de restrição de enzimas. Disponível em: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/ppic9\\_map.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/ppic9_map.pdf) (pg. 107).

**Figura 4.9:** A) Sintomas virais em amostra de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão após transmissão por mosca branca. Sintomas de mosaico e amarelecimento foram observados e a presença dos vírus StyMaV-1 e StyMaV-2 foi confirmada por RT-PCR na mesma amostra. B) Os fragmentos amplificados nas reações de PCR possuem 1,5pb que correspondem às regiões NIB (parcial) e CP desses vírus. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% com tamanho de 500 pb para cada vírus de acordo com o marcador de 100 pb da *Ludwig* (pg. 110).

**Figura 4.10:** A) Sintomas virais (mosaico e amarelecimento) em amostra de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão em uma das amostras após transmissão por mosca branca. A presença do vírus CPMMV (*Carlavirus*) foi confirmada por RT-PCR. B) O fragmento amplificado que corresponde a CP do *Carlavirus* foi visualizado em gel de agarose 1% com tamanho de 500 pb de acordo com o marcador de 100 pb da *Ludwig* (pg. 111).

**Figura 4.11: Resultados da inoculação mecânica de styloviruses.** A) Trifólio *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão com sintomas de mosaico moderado causado pelo StyMaV-2 B) Trifólio de *Stylosanthes guianensis* cv. Bela com sintomas de mosaico amarelo causado pelo StyYMV (pg. 112).

**Figura 4.12: Resultado da transmissão de styloviruses via mosca branca.** A) Trifólio de estilosantes cv. Mineirão. Controle negativo B) Trifólio de estilosantes cv. Mineirão com o isolado 2D (StyMaV-2) após transmissão por mosca branca, apresentando sintomas de mosaico moderado C) Trifólio de estilosantes cv. Mineirão com o isolado 3A (StyYMV) após transmissão por mosca branca, apresentando sintomas de mosaico amarelo intenso D) Trifólio de estilosantes cv. Bela. Controle negativo E) Trifólio de estilosantes cv. Bela com o isolado 2D (StyMaV-2) após a transmissão por mosca branca, apresentando sintomas de mosaico

moderado. Trifólio de estilosantes cv. F) Trifólio de estilosantes cv. Bela com o isolado 3A (StyYMV) após transmissão por mosca branca, apresentando sintomas de mosaico amarelo intenso (pg. 113).

**Figura 4.13:** A) Transmissão por mosca branca do isolado 2D (StyMaV-2) para duas plantas de estilosantes cv. Mineirão (A e B) e duas plantas da cv. Bela (C e D), C1 é o controle negativo do experimento com mosca branca, C2 é o controle negativo da PCR (com água) e 22 é o acesso GC 22 usado no sequenciamento via HTS contendo os vírus de estilosantes (StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV). B) Transmissão por mosca branca dos isolados 3A e 8A (StyYMV) para duas plantas de estilosantes cv. Mineirão (A e B) e quatro da cv. Bela (C e D), em ambos isolados, C1 é o controle negativo do experimento com mosca branca, C2 é o controle negativo da PCR (com água) e 22 é o acesso GC 22. O marcador molecular usado foi de 1kb da Ludwig e os fragmentos amplificados possuem aproximadamente 850 e 890 pb que correspondem aos genes da CP do StyMaV-2 e StyYMV, respectivamente (pg. 113).

**Figura 4.14:** Os fragmentos amplificados nas PCRs e as digestões dos vetores pGEM e pET28a foram visualizados em gel de agarose 1%. CP1 e CP2 com amplicons de 850 pb, CP3 com 660 pb e os vetores pGEM e pET28a apresentando fragmentos correspondentes a 3015 pb e 5369 pb respectivamente de acordo com o marcador de 1000 kb da Ludwig (pg. 114).

**Figura 4.15:** Gel de poliacrilamida da fração insolúvel mostrando a expressão das proteínas em *E. coli* no vetor pET28a. De acordo com o marcador *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen), as proteínas CP1, CP2 e CP3 (correspondendo a StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV, respectivamente) possuem 37kDa, 38kDa e 26kDa contando com a cauda de histidina que foi adicionada (pg. 115).

**Figura 4.16:** Western Blotting com o anti-his confirmou a expressão das proteínas em *E. coli* no vetor pET28a. Os tempos T0 e T4 (da fração insolúvel) equivalem aos períodos antes e após a expressão. O tamanho das proteínas CP1, CP2 e CP3 foi confirmado e possuem 37kDa, 38kDa e 26kDa (correspondendo a CP de StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV) respectivamente, de acordo com o marcador de proteína *PageRuler Protein Ladder* (ThermoFisher) (pg. 115).

**Figura 4.17:** Os fragmentos amplificados nas PCRs foram visualizados em gel de agarose 1%. CP1, CP2 e CP3 (correspondendo a CP de StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV) com amplicons de 750 pb, 850 pb e 800 pb respectivamente de acordo com o marcador de 100 pb da Ludwig (pg. 116).

**Figura 4.18:** Eletroforese em gel de agarose 1%. Fragmentos de DNA após as digestões com enzima SalI. Clones A1: CP do StyMaV-1 com o vetor pPIC9, clone B1: CP do StyMaV-2 com o vetor pPIC9 e clone C1: CP do StyYMV com o vetor pPIC9. Os fragmentos correspondem a 8800pb à direita, o vetor pPIC9 vazio com um fragmento que corresponde a 8000pb de acordo com o marcador molecular (M) de 1kb da Ludwig (pg. 116).

**Figura 5.1:** Representação esquemática das reações de recombinação BP (a) e LR (b) que constituem a base da tecnologia Gateway (Disponível em: Faggionato, 2010) (pg. 127).

**Figura 5.2:** Representação esquemática das construções realizadas de acordo com as regiões N e C- terminais das proteínas. A) representação da fusão N-terminal e B) representação da fusão C-terminal, o símbolo em vermelho representa o códon de parada que foi inserido (TTA) no final da proteína (pg. 129).

**Figura 5.3:** Representação esquemática do vetor de entrada pDONR207 que possui 5.585pb. É possível ver a presença dos sítios *attPs* que são locais de recombinação específicos e que permitem a recombinação com o vetor de destino, a presença do gene cassete (*ccdB*) que codifica uma proteína letal para a bactéria e uma marca de seleção por antibiótico que é gentamicina. Esse vetor foi usado para recombinar os genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP a partir do Sistema Gateway (Disponível em: Sgamma, 2010) (pg. 131).

**Figura 5.4:** Representação esquemática do vetor de destino pK7FWG2 que possui 11.880pb. Esse vetor foi usado para recombinar os genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP.

É possível observar os sítios de recombinação *attRs* e uma marca de seleção para o antibiótico espectinomomicina (Adaptado- Disponível em: Sze, 2010) (pg. 132).

**Figura 5.5:** Representação esquemática do vetor de destino pK7WGF2 que possui 11.876pb. Esse vetor foi usado para recombinar os genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP. É possível observar os sítios de recombinação *attRs* e uma marca de seleção para o antibiótico espectinomomicina (Adaptado- Disponível em: Sze, 2010) (pg. 132).

**Figura 5.6: Resultado da amplificação dos genes** selecionados por RT-PCR usando *OlidodT* e iniciadores específicos como mostrado nos géis A, B, C, D, E e F. Os genes P1-Pro.2, HC.2, VPg, NIa.2 e CP.2 pertencem ao StyMaV-2 e os genes P1-Pro.3, HC.3, VPg.3, NIa.3, e CP.3 pertencem ao StyYMV. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% usando o marcador de 100 pb da *Ludwig* (pg. 134).

**Figura 5.7:** Resultado da extração de DNA plasmidial em gel de agarose 1% da PCR de cinco colônias selecionadas do gene da CP do vírus StyMaV-2 com o GFP fusionado nas regiões N e C- terminais dessas proteínas. CP (~850 pb) recombinada em vetor pDONR207 (5585 pb) totalizando um fragmento de ~6430 pb. A seta branca indica as colônias que foram selecionadas para sequenciamento. Foi feito o mesmo com as demais proteínas, sendo escolhida a CP do vírus StyMaV-2 como exemplo do que foi realizado (pg. 135).

**Figura 5.8:** Resultado da PCR de colônia em gel de agarose 1% da PCR (usando oligonucleotídeos específicos com consta na tabela 5.1) de cinco colônias selecionadas do gene da CP do vírus StyMaV-2 com o GFP fusionado nas regiões N e C- terminais dessas proteínas. As setas brancas indicam as colônias que foram selecionadas. Foi feito o mesmo com as demais proteínas, sendo escolhida a CP do vírus StyMaV-2 como exemplo do que foi realizado (pg. 135).

**Figura 5.9:** Visualização em microscópio confocal Leica TCS SP2 da expressão transiente das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV, fusionadas com eGFP, nas regiões N e C terminais das proteínas alvo, e agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* 4 dpa. A) Controle: planta transgênica de *N. benthamiana* (NB 16C) – GFP emitindo fluorescência. B) P1-Pro com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. C) HC-Pro com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. D) VPg com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. E) NIa-Pro com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. F) CP com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. Barra de 100 µm (pg. 138).

**Figura 5.10:** Visualização de fluorescência em microscopia confocal da expressão transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana* das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV fusionadas com GFP 4 dias após a agroinfiltração. Presença de grânulos no citoplasma (seta branca) da localização das proteínas P1-Pro e HC-Pro fusionadas na região C-terminal da proteína GFP (A), VPg fusionada na região N-terminal da proteína fluorescente (B) e CP fusionada na região C-terminal do GFP (B), para ambos os vírus (pg. 140).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.1:** Sítios de clivagem e proteínas presentes nas poliproteínas de representantes de cada gênero dentro da família *Potyviridae* (Adams *et al.*, 2005) (pg. 31).

**Tabela 1.2:** Proteínas produzidas pelos membros da família *Potyviridae* e suas características multifuncionais (pg. 35).

**Table S1 (Chapter 2):** The cleavage sites were predicted in the stylos based on functional assays from other potyvirids. Conserved domains were observed between StyMaV-1 and StyMaV-2 (pg. 68).

**Table S1 (Chapter 3):** The cleavage sites were predicted in the Stylo yellow mosaic virus (StyYMV in red) based on functional assays from other potyvirids (pg. 85).

**Tabela 4.1:** Iniciadores sintetizados para amplificação parte da proteína NIb e a proteína CP completa dos “stylovirus” (pg. 98).

**Tabela 4.2:** Iniciadores sintetizados para amplificação dos genes da CP dos “styloviruses” (pg. 103).

**Tabela 4.3:** Propriedades das proteínas CPs (pg. 106).

**Tabela 4.4:** Iniciadores sintetizados para amplificação dos genes da CP dos “styloviruses” (pg. 108).

**Tabela 5.1:** Iniciadores sintetizados para amplificação dos genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV (pg. 129).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

6k1: *peptide 6 kilo Dalton type 1* (peptídeo 6 quilo Dalton tipo 1)

6k2: *peptide 6 kilo Dalton type 2* (peptídeo 6 quilo Dalton tipo 2)

7k: *peptide 7 kilo Dalton* (peptídeo 7 quilo Dalton)

9k: *peptide 9 kilo Dalton* (peptídeo 9 quilo Dalton)

aa: aminoácido (*amino acid*)

AGO: *argonaute* (argonauta; família de proteínas)

AlkB: alcano hidroxilase tipo B (proteína multifuncional)

amiRNA: micro RNA artificial

ATPase: adenosinatrifosfatases (enzimas que catalisam ATP)

AUAP: *Abridged Universal Amplification Primer* (oligonucleotídeo de abreviação universal)

BA: Bahia (estado do Brasil)

C- terminal: região carboxil terminal de uma proteína

C2H2: motivo *zinc finger* composto por duas cisteínas (C) e duas histidinas (H)

CI: *cylindrical inclusions* (inclusões cilíndricas)

CNPGC: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte

CP: *capside protein* (proteína do capsídeo ou capa protéica)

cv: cultivar

D: ácido aspártico (aminoácido)

DCL: *dicer like protein* (proteína que degrada RNA fita dupla)

dCTP: deoxinucleotídeo citosina trifosfato (sequência de oligonucleotídeo de citosina)

DF: Distrito Federal

DNA: *desoxyribonucleic acid* (ácido desoxiribonucléico)

dsRNA: *double stranded RNA* (RNA fita dupla)

E: glutamato (aminoácido)

EEB: Estação Experimental de Biologia

eIF4E: fator de iniciação de tradução eucariótica do tipo 4E

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organização Mundial de Alimentação e Agricultura)

FRNK: domínio composto por fenilalanina (F), arginina (R), asparagina (N) e lisina (K)

G: glicina (aminoácido)

GC: Gado de Corte

H: histidina (aminoácido)

HAM1h: proteína do tipo pirofosfatase

HC-Pro: *helper component proteinase protease* (componente auxiliar proteinase do tipo protease)

hpRNA: *hairpin* RNA

HTS: *High Throughput Sequencing* (Sequenciamento de Alto Desempenho)

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

kb: *kilobase* (quilobase; medida de peso molecular para DNA e RNA)

kDa: *kilo Dalton* (quilo Dalton; medida de peso molecular para proteína)

LB: meio bacteriano Luria Bertani

mRNA: RNA mensageiro

miRNA: micro RNA

MS: Mato Grosso do Sul (estado do Brasil)

N- terminal: região amino terminal de uma proteína

NIa-Pro: *inclusions nuclears type a protease* (protease de inclusões nucleares tipo a)

NIb: *inclusions nuclears type b protein* (proteína de inclusões nucleares tipo b)

nm: nanômetro

nt: nucleotídeo (*nucleotide*)

ORF: *Open Read Frame* (quadro de leitura aberto)

P1a: *proteinase 1 type a* (proteinase 1 tipo a)

P1b: *proteinase 1 type b* (proteinase 1 tipo b)

P1-Pro: *proteinase 1 protease* (protease proteinase 1)

P2: *protein 2* (proteína 2)

P3: *protein 3* (proteína 3)

PAA: período de aquisição alimentar

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia de polimerase)

PIPO: *Pretty Interesting Potyvirus ORF*

PISPO: *Pretty Interesting Sweet Potato Potyvirus ORF*

poliA: sequência nucleotídica de várias adeninas

PTGS: *Post-Transcriptional Gene Silencing* (silenciamento gênico a nível pós-transcricional)

RACE: *Rapid Amplification of cDNA Ends* (rápida amplificação das extremidades de cDNA)

RISC: *RNA-induced silencing complex* (complexo ribonucleoproteico que induz o silenciamento gênico)

RPM: rotação por minuto

RpRd: RNA polimerase RNA dependente

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RNase: enzima que degrada RNA

RT: *reverse transcriptase* (transcriptase reversa)

S: serina (aminoácido)

spp.: espécies

siRNA: *small RNA*

StyMaV-1: Stylo mosaic-associated virus 1

StyMaV-2: Stylo mosaic-associated virus 2

StyYMV: Stylo yellow mosaic virus

TdT: desoxinucleotidil- transferase terminal (enzima que liga nucleotídeos a uma cadeia oligo)

TGS: *transcriptional gene silencing* (silenciamento gênico transcricional)

tRNA: RNA transportador

UTR: *untranslated region* (região não traduzida)

V: valina (aminoácido)

VIGS: *Virus Induced Gene Silencing*

VPg: *Viral Protein genome-linked* (proteína viral ligada ao genoma)

vsRNA: *virus-derived small RNA*

X: representa qualquer aminoácido de acordo com as normas da IUPAC

Y: tirosina (aminoácido)

## RESUMO

No Brasil, as culturas forrageiras representam grandes áreas de pastagens tropicais para alimentação do gado. Estas pastagens podem ser naturais ou plantadas e são compostas por gramíneas e leguminosas forrageiras. O uso de *Stylosanthes* spp. (leguminosa) têm aumentado no Brasil devido ao seu valor nutricional e por apresentar grande potencial na fixação de nitrogênio. Nos últimos anos, sintomas de mosaico semelhantes àqueles causados por infecções virais foram observados no campo, indicando que esta leguminosa forrageira pode ser suscetível a esses patógenos. Amostras de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão apresentando sintomas típicos de vírus foram coletadas e submetidas ao sequenciamento de alto desempenho (HTS). Resultados obtidos pelo sequenciamento nessas amostras sintomáticas de estilosantes oriundas do campo experimental da Embrapa Gado de Corte mostraram a presença de três novos vírus pertencentes à família *Potyviridae*, os “styloviruses”. Simultaneamente, foi feita a montagem dos *contigs* e então, desenvolvidas ferramentas de detecção por RT-PCR a partir das sequências consenso obtidas via HTS. Os fragmentos genômicos foram amplificados e sequenciados pelo método Sanger e análises filogenéticas comparativas de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) das proteínas virais com base na poliproteína codificada pelos diferentes vírus foram realizadas. Essas análises demonstraram que estes vírus representam novas espécies dentro da família e foram tentativamente nomeados como “*Stylosanthes* mosaic-associated virus 1” (StyMaV-1), “*Stylosanthes* mosaic-associated virus 2” (StyMaV-2) e “*Stylosanthes* yellow mosaic virus” (StyYMV). Baseado no critério taxonômico de demarcação de espécies os vírus StyMaV-1 e StyMaV-2 pertencem a um novo gênero dentro da família *Potyviridae* (tentativamente denominado “*Stylomovirus*”) e o StyYMV encontra-se dentro de um gênero já existente (*Roymovirus*). Análises filogenéticas mostraram que StyMaV-1 e StyMaV-2 estão mais relacionados com o *Blackberry virus y* (*Brambyvirus*) e o StyYMV está mais relacionado com o *Rose yellow mosaic virus* (*Roymovirus*) de acordo com a identidade das sequências de nt e aa da capa proteica (CP). Além da caracterização molecular e análise filogenética, os resultados alcançados até o presente, demonstraram que os novos vírus caracterizados são transmitidos por mosca branca (MEAM 1) e os vetores construídos permitiram a expressão eficiente de proteínas virais acopladas a marcadores específicos para estudo de interações de proteínas virais e celulares *in vivo*.

**Palavras-chave:** Epidemiologia, Gado de Corte, pastagens, Mineirão, *Stylomovirus*.

## ABSTRACT

In Brazil, forage crops represent large areas of tropical pasture for cattle feeding. These pastures can be natural or planted and are composed of grasses and forage legumes. The use of *Stylosanthes* spp. (legume) has increased in Brazil because of its nutritional value and of its great potential in the nitrogen fixation. In the last years, virus-like mosaic symptoms were observed in the field, indicating that this forage legume may be susceptible to these pathogens. Samples of *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão presenting typical virus symptoms were collected and submitted to high performance nucleotide sequencing. Results obtained by sequencing in these symptomatic samples of “estilosantes” from the experimental field of Embrapa Beef Cattle detected the presence of three new viruses belonging to the *Potyviridae* family, the “styloviruses”. Simultaneously, the contigs were assembled and then RT-PCR detection tools were developed from the HTS consensus sequences. The fragments were amplified and sequenced by the Sanger method and comparative phylogenetic analyzes of nucleotides (nt) and amino acids (aa) of the viral proteins based on the polyprotein were performed. These analyzes have demonstrated that these viruses represent new species within the family and have been tentatively named “*Stylosanthes* mosaic-associated virus 1” (StyMaV-1), “*Stylosanthes* mosaic-associated virus 2” (StyMaV-2) and “*Stylosanthes* yellow mosaic virus” (StyYMV). Based on the taxonomic criterion of species demarcation the StyMaV-1 and StyMaV-2 viruses belong to a new genus within the family *Potyviridae* (tentatively denoted *Stylomovirus*) and StyYMV is within an existing genus (*Roymovirus*). Phylogenetic analyzes have shown that StyMaV-1 and StyMaV-2 are more related to the *Blackberry Virus Y* (*Brambyvirus*) and StyYMV is more related to the *Rose Yellow Mosaic Virus* (*Roymovirus*) according to the identity of the nt and aa sequences of the coat protein (CP). In addition to the the molecular characterization and phylogenital studies, the results obtained so far, demonstrated that the new viruses characterized are transmitted by whitefly (MEAM 1) and the constructed vectors allowed the efficient expression of viral proteins coupled to specific markers for the study of viral and cellular protein interactions *in vivo*.

**Keywords:** Epidemiology, Beef Cattle, pastures, Mineirão, *Stylomovirus*.

## INTRODUÇÃO GERAL

Tolerante a solos ácidos e com baixa fertilidade, estilosantes possui alto valor nutricional e o gênero ao qual pertence, *Stylosanthes*, possui o maior número de cultivares dentre as leguminosas tropicais usadas como pastagens (Simioni *et al.*, 2014). Existe um grande potencial na utilização dessa leguminosa em recuperação de pastagens e de áreas degradadas devido à fixação de nitrogênio, tornando-a capaz de crescer em regiões muito arenosas, sendo muito resistente à seca (Herling & Pereira, 2016).

Essas leguminosas apresentam boa adaptação e desempenho em todas as regiões do país e é recomendada para ser utilizada em associação com culturas anuais como adubo verde. A principal forma de utilização de estilosantes é em consorciação com gramíneas para alimentação do gado bovino (Barcelos *et al.*, 2008). Três cultivares que foram desenvolvidas pela parceria entre as Embrapa Gado de Corte e Embrapa Cerrados são utilizadas nesses consórcios com gramíneas: Campo Grande, Mineirão e Bela (Andrade *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012; Matilda *et al.*, 2013).

A cultivar Campo Grande é uma mistura física entre linhagens de *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala* apresentando bom desempenho em solos com textura arenosa e média (Costa *et al.*, 2016). A cultivar Mineirão possui tolerância à antracnose, altos teores de proteína bruta e bom desempenho em solos com textura areno-argilosa com baixa/média fertilidade (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013). A cultivar Bela é composta por uma mistura física de sementes de dois cultivares de *Stylosanthes guianensis*, que se desenvolvem bem em solos pouco férteis, sendo também tolerante aos nematoides do gênero *Pratylenicus* (Fernandes, 2019).

Atualmente as pastagens têm sofrido uma degradação intensa devido às práticas inadequadas de manejo, pisoteio animal e principalmente por causa de pragas e doenças. Nem sempre os patógenos causadores das doenças são identificados, com isso, há dificuldades no estabelecimento de medidas específicas para o manejo de doenças em plantas forrageiras. Quanto às doenças de etiologia viral, há relatos nos últimos 10 anos da ocorrência de sintomas típicos de infecções por esses agentes, tais como: mosaico, amarelecimento e nanismo em diversas plantas forrageiras (Marchi *et al.*, 2011).

Existe uma escassez de dados na literatura a respeito de infecções virais em plantas forrageiras. A falta de conhecimento desses agentes etiológicos, demonstra a necessidade de realizar-se um levantamento desses patógenos em áreas de pastagens, visando a antecipação

dos prejuízos e danos econômicos potenciais que podem ser causados, possibilitando o desenvolvimento de estratégias de controle de vírus nesses cultivos.

Dentro desse contexto, um trabalho realizado anteriormente por esse grupo de pesquisa (de Souza *et al.*, 2021), obteve resultados via sequenciamento de alto desempenho (HTS) em duas amostras sintomáticas de *Stylosanthes guianensis*, oriundas da Embrapa Gado de Corte, onde foi possível detectar a presença de três novos vírus pertencentes à família *Potyviridae*. A partir disso, iniciou-se uma caracterização biológica e molecular desses vírus com o intuito de conhecer o processo de infecção e em uma etapa posterior, propor estratégias de controle.

## JUSTIFICATIVA

As pastagens são muito importantes para o sistema produtivo brasileiro na agropecuária e isso é constatado pela grande área agricultável que ocupam. O mercado de sementes de forrageiras movimenta milhões de dólares e o Brasil ocupa o segundo lugar como maior produtor de carne bovina do mundo. Essa produção tem aumentado significativamente nas últimas três décadas devido ao uso de novas tecnologias que têm influenciado no manejo adequado dessas plantas em campo.

No entanto, nesses últimos anos, plantas sintomáticas têm sido encontradas, tanto em gramíneas quanto em leguminosas forrageiras, tornando-se um problema potencial. Devido à falta de conhecimento desses agentes etiológicos e do tipo de interação que há entre esses patógenos e suas hospedeiras, torna-se necessário o conhecimento biológico, molecular e epidemiológico desses vírus que estão causando problemas nessas culturas, possibilitando o conhecimento da doença e posteriormente o delineamento de estratégias de controle desses patógenos.

Além disso, esses estudos podem estimar o risco potencial desses vírus infectarem outras leguminosas de alta importância econômica para o Brasil como feijão e soja. Diante da problemática observada em campos naturais, cultivados ou experimentais, os quais apresentam várias espécies forrageiras com sintomas de infecções virais semelhantes àqueles causados pelos membros da família *Potyviridae*, o presente trabalho visou à caracterização dos vírus encontrados na etapa inicial desse trabalho e o estudo da interação vírus/hospedeiro/vetor utilizando-se várias estratégias biológicas e moleculares.

## **OBJETIVO GERAL**

Realizar a caracterização biológica, molecular e epidemiológica dos novos vírus membros da família *Potyviridae*, capazes de infectar estilosantes com o intuito de entender a relação agroecológica existente e possibilitar a proposta de medidas de controle desses patógenos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar dos genomas dos vírus de estilosantes;
- Realizar ensaios de transmissão por potenciais vetores desses vírus e desenvolver ferramenta sorológica para detecção;
- Co-localizar as principais proteínas desses vírus nos tecidos vegetais e;
- Avaliar os mecanismos de interação entre esses patógenos e as plantas hospedeiras

## **HIPÓTESE CIENTÍFICA**

→ Os sintomas de infecção viral encontrados em plantas de estilosantes em campos experimentais no Brasil, podem ser causados por novas espécies virais e estabelecem novas interações vírus/hospedeiro/vetor.

# CAPÍTULO 1:

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 A importância da carne bovina e do cultivo de forrageiras no Brasil

De acordo com Aragão & Contini (2020), o Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo e tem ocupado essa posição desde 2004. Possui um rebanho composto por 218,2 milhões de cabeças de gado onde um quinto da carne comercializada é vendido em mais de 180 países, tornando-se uma das principais atividades da economia brasileira. Nos últimos 20 anos as exportações fecharam em 2,2 milhões de toneladas, suprimindo 14,4% do mercado internacional tornando-o o principal exportador mundial do produto (Aragão & Contini, 2020).

Hong Kong e China se revezaram como os principais parceiros comerciais ao longo de 2018, sendo Hong Kong responsável por 24% do total exportado pelo Brasil, ou seja, 395 mil toneladas. Já a China, em termos de faturamento, representa cerca de 20% do total, o equivalente a US\$ 1,49 bilhões (ABIEC, 2019). Pouco mais de 95% da carne bovina brasileira é produzida pelo sistema de pastagem que ocupa uma área total de aproximadamente 156 milhões de hectares (MAPBiomias, 2020).

Em virtude dessa realidade, o Brasil tem um dos menores custos de produção de carne do mundo, já que a “colheita” é feita predominantemente pelo próprio animal, por meio do pastejo, resultando em uma carne mais saudável (Ferraz & Felício, 2010). Existem outras estratégias eficazes que são adotadas pelo sistema agropastoril brasileiro que são capazes de aumentar ainda mais a eficiência da produção tais como: os investimentos no uso de calagem e adubação, práticas culturais e manejo animal (Carvalho *et al.*, 2018).

As pastagens desempenham um papel fundamental na pecuária brasileira e o consórcio entre gramíneas e leguminosas forrageiras passa a representar a principal fonte de alimento para o rebanho brasileiro que é o segundo maior do mundo. (Dias-Filho, 2014). Porém, essas áreas têm diminuído em determinadas regiões do Brasil devido à expansão de áreas agrícolas dando espaço a monoculturas (milho e soja), como também por falta de adubações periódicas (Barbosa *et al.*, 2015).

Segundo a FAO (2021) aproximadamente 30% das terras em processo de degradação estão em zonas ou muito áridas ou sub-áridas secas e pouco mais de 70% encontram-se em regiões mais úmidas. Por conta disso, as regiões Sul e Nordeste, têm feito uso de novas técnicas de manejo do solo e obtenção de cultivares mais adaptadas aos determinados tipos de clima, colaborando também para a qualidade da alimentação do rebanho (Carvalho *et al.*, 2018).

## 1.2 O consórcio entre gramíneas e leguminosas forrageiras

Manter duas culturas em uma mesma área para obter um aumento da produção, melhor qualidade, mais rendimento e oferta de alimento, enriquecimento da vida biológica do solo e proteção contra a degradação, é o objetivo principal do consórcio entre gramíneas e leguminosas forrageiras tropicais. Porém, a disponibilidade de cultivares que possuem características adequadas para formar consórcios promissores é um desafio, já que isso vai depender do sucesso nos programas de melhoramento (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

As leguminosas forrageiras podem contribuir significativamente com o seu alto valor nutricional e também devido a sua capacidade de fixação de nitrogênio que é muito importante para o sistema agropastoril. Já no caso das gramíneas, além de serem a principal fonte de alimentação do maior rebanho comercial de bovinos do mundo, possuem características a diferentes climas e solos que contribuem para sua ampla dispersão (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

No entanto, para adotar a técnica de consórcio é preciso avaliar algumas características, tais como as diferenças morfológicas entre as gramíneas e as leguminosas. Apesar dos anos de pesquisa, ainda não há um número significativo de gramíneas e leguminosas que sejam compatíveis e persistentes. Para obter sucesso no uso do consórcio, é fundamental que tanto a gramínea quanto a leguminosa escolhidas, tenham características necessárias para obter um consórcio persistente, produtivo e resiliente (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

O sucesso no consórcio dependerá, além da compatibilidade entre gramínea e leguminosa, também do manejo adequado para que não comprometa a produtividade de ambas (Shonieski *et al.*, 2011). O uso de leguminosas forrageiras do gênero *Stylosanthes* spp. em consórcio com gramíneas dos gêneros *Urochloa* spp, *Brachiaria* spp e *Andropogon* spp tem beneficiado o sistema agropastoril proporcionando consórcios harmônicos (Diehl *et al.*, 2013).

Além disso, os pastos consorciados trazem melhor qualidade do pasto, maior ganho de peso animal, economia nos gastos com adubação nitrogenada, recuperação de áreas degradadas, maior cobertura e melhor proteção do solo, garantindo assim um processo não poluente e ambientalmente correto. Isso mostra que o uso de leguminosas em consórcio com gramíneas promove a sustentabilidade dos sistemas pastoris (Shonieski *et al.*, 2011).

Sendo assim, obter cultivares de gramíneas e leguminosas forrageiras com características adequadas para formar consórcios promissores é o fator principal para alcançar o sucesso dessa tecnologia. Entretanto, já se sabe que para cada ideótipo de gramínea existe uma leguminosa adequada. Atualmente, as leguminosas do gênero *Stylosanthes*, vem apresentando bom

desempenho em pastos consorciados com diferentes espécies de gramíneas (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

### 1.3 Leguminosas do gênero *Stylosanthes* spp.

As leguminosas do gênero *Stylosanthes* originaram-se na América Latina e atualmente ocorrem em todo o Brasil, sendo este o país que abriga a maior diversidade do gênero. São plantas herbáceas semiperenes com longevidade média de dois anos e apresentam como principais características folhas trifolioladas e hábito de crescimento semiereto, podendo atingir altura média entre 80-130 cm (Almeida *et al.*, 2016).

Esse gênero faz parte da família Fabaceae e têm sido cada vez mais estudado devido suas qualidades como forrageiras, alta capacidade de adaptação aos diversos ambientes e por proporcionar proteção ao solo durante períodos de seca, além do uso como adubo verde e banco de proteínas devido ao seu alto valor nutritivo, sendo usada como complemento na alimentação de animais (Fernandes, 2019).



**Figura 1.1:** *Stylosanthes* spp. em campo experimental da Embrapa Gado de Corte (março de 2014). Foto: Silvia Rahe Pereira- CNPGC.

Segundo Costa (2016), cerca de 50 espécies distribuídas pela Ásia, África e América Latina onde aproximadamente 30 espécies ocorrem apenas no Brasil, principalmente no bioma Cerrado, sendo 25 espécies tolerantes à seca com adaptação a solos de baixa fertilidade. São leguminosas cultivadas na América subtropical e na Austrália, onde em termos de estudos na área de pesquisa com estilósantes, este país é referência. Os cultivares presentes atualmente no mercado, são provenientes de espécies como *Stylosanthes guianensis*, *Stylosanthes capitata*, *Stylosanthes macrocephala*, *Stylosanthes scabra*, *Stylosanthes hamata*, *Stylosanthes humilis* e *Stylosanthes seabrana* (Lewis *et al.*, 2005).

Porém, no Brasil, apesar do reconhecimento do gênero *Stylosanthes* ter ocorrido por volta dos anos 40, até 2000 foram liberados apenas seis cultivares, mesmo assim, essas têm ganhado

relevância devido ao seu valor nutricional e sua alta capacidade de persistência no campo (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013). Só em Mato Grosso do Sul existem 17 espécies que podem ocorrer em diferentes fitofisionomias tais como: cerrado, cerradão, campo sujo e chaco.

Dentre essas 17 espécies, existem três principais que possuem potencial de uso no cenário pecuário brasileiro, por se desenvolverem bem em solos com baixa fertilidade, serem tolerantes à diversas doenças e por apresentarem consórcios harmônicos com determinadas gramíneas como é o caso das espécies *Stylosanthes guianensis*, *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala* (Valdo & Pereira, 2016).

Grande parte das espécies de estilosantes ocorre como plantas invasoras ou colonizadoras em pastagens nativas, além de se desenvolverem em solos ácidos. A principal forma de persistência dessas plantas no campo é através da ressemeadura natural. (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013). Atualmente, as três cultivares que se encontram no mercado são: Mineirão (Figura 1.2-A), Campo Grande (Figura 1.2-B) e Bela (Figura 1.2-C) (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013; Fernandes, 2019).



**Figura 1.2:** Cultivares comerciais. *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (A), *Stylosanthes guianensis* cv. Campo Grande (B) e *Stylosanthes guianensis* cv. Bela (C) em campo experimental. Fonte: <https://www.mfrural>; <https://www.cearasementes>; <https://www.embrapa.org>

Além do estilosantes ser uma leguminosa rica em proteína, o uso dela nas pastagens apresenta outras vantagens tais como: a fixação de nitrogênio no solo através da relação simbiótica com bactérias do gênero *Rhizobium*, trazendo vantagens para as gramíneas forrageiras quando em consórcio, o aumento do teor de proteína na alimentação dos animais proporcionando uma maior produtividade por hectare e com uma aceitabilidade para bovinos (Andrade *et al.*, 2013).

#### 1.4 Doenças nas pastagens, com foco em estilósantes

Estima-se que cerca de 50% das áreas de pastagens encontram-se em processo de degradação e menos de 20% são consideradas em bom estado. Fatores como a expansão de áreas de pastagens cultivadas e longos períodos de chuva, colaboraram para o surgimento de diversas doenças em forrageiras afetando sua produtividade e qualidade, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Norte. O ataque de pragas e o manejo inadequado de doenças também têm colaborado para a degradação de pastagens, limitando o potencial produtivo e a qualidade das forrageiras (Dias-Filho, 2011).

Sabe-se que vários dos problemas fitopatogênicos observados em áreas de pastagens também ocorrem devido ao uso de sementes contaminadas que podem agir como antagonistas e disseminar patógenos de plantas forrageiras. Percebendo a relevância do papel da semente, é fundamental a obtenção de materiais de qualidade fitossanitária (Marchi *et al.*, 2011). Doenças importantes que ocorrem nos sistemas de produção de pastagens, geralmente são decorrentes de fungos patogênicos que pertencem aos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*, como também fitonematoides do gênero *Pratylenchus*.

Com relação ao estilósantes, a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) é a doença que mais afeta essa leguminosa, prejudicando seu crescimento, a produção de sementes e sua persistência no campo (Dias-Filho, 2014). Infelizmente, nem sempre os patógenos responsáveis por algumas doenças são identificados e o conhecimento a respeito desses agentes etiológicos, que prejudicam a produtividade das pastagens, torna-se algo pouco explorado dificultando as medidas de controle e manejo dessas doenças (Dias-Filho, 2011).

Nos últimos 10 anos começaram a surgir relatos de plantas forrageiras em campo apresentando sintomas de mosaico, amarelecimento e nanismo, que são típicos de infecções virais (Marchi *et al.*, 2011). Os relatos e estudos a respeito de infecções virais, bem como, os danos econômicos causados por essas infecções em plantas forrageiras no Brasil são escassos. São poucas e antigas as informações a respeito de vírus infectando naturalmente espécies do gênero *Stylosanthes*, e mesmo assim, nenhum deles foi totalmente caracterizado (Morales *et al.*, 1991; Kitajima, 2020).

Diante desse cenário, observa-se a necessidade em realizar estudos biológicos e de caracterização capazes de conceder um levantamento adequado desses patógenos. Tais estudos são importantes e ajudam a propor medidas de manejo e controle eficazes. Os vírus que se destacam por infectar tanto gramíneas quanto leguminosas forrageiras são vírus disseminados pelo mundo e geralmente estão concentrados na família *Potyviridae* (Silva *et al.*, 2013).

## 1.5 Família *Potyviridae*

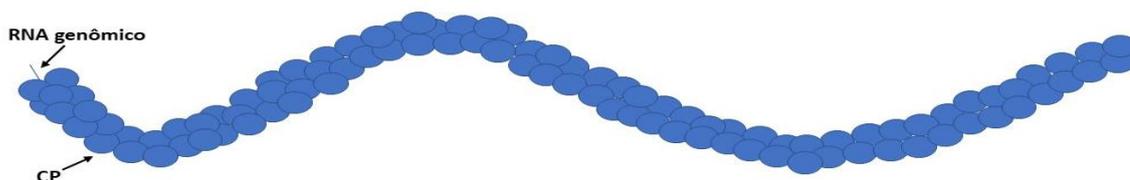
A família *Potyviridae* é a segunda maior família de vírus de planta, sendo uma das mais estudadas, e do ponto de vista econômico, é importante por transmitir diversas doenças que afetam uma ampla gama de hospedeiras (King *et al.*, 2012). Segundo o último relatório do *International Committee on Taxonomy of Viruses- ICTV* (2021), a família *Potyviridae* possui 235 espécies e estas estão distribuídas em 12 gêneros.

A classificação de gênero dentro da família é de acordo com a gama de hospedeiras, organização genômica, o vetor de transmissão e o número de componentes que compõem o genoma viral (Wylie *et al.*, 2017). Devido sua ampla gama de hospedeiras, diversidade de vetores e distribuição mundial, os potyvirus têm excelente adaptação a novas hospedeiras e ambientes.

Os fatores que conferem aos potyvirus essa adaptabilidade ainda não são bem compreendidos, porém, sabe-se que existem eventos de recombinação genômica onde ocorre trocas de fragmentos do genoma entre vírus distintos durante infecções mistas, gerando variabilidade genética e possível adequação às diferentes hospedeiras e vetores de transmissão (Nigam *et al.*, 2019).

### 1.5.1 Organização genômica da família *Potyviridae*

São compostos por uma molécula de RNA fita simples senso positivo, sendo essa fita protegida pela proteína da capa proteica (CP). Dentro da taxonomia da família *Potyviridae* existe um critério de demarcação para determinar uma nova espécie com base nas sequências de aminoácidos (aa) e de nucleotídeos (nt) da CP. Portanto, para determinar uma nova espécie dentro da família, a identidade da sequência de aa da CP deve ser abaixo de 80% e a de nt abaixo de 76% (Adams *et al.*, 2017). Os membros da família *Potyviridae* possuem partículas filamentosas e flexuosas não envelopadas (Figura 1.3) (Adams *et al.*, 2012).



**Figura 1.3:** Esquema da partícula viral de membros da família *Potyviridae*. Partícula alongada e flexuosa com simetria helicoidal. Proteína do capsídeo (CP) envolvendo todo o RNA genômico (em azul).

O genoma é composto por um RNA que codifica uma poliproteína, em que ligada covalentemente à sua extremidade 5'UTR está a proteína VPg, que atua como um precursor da replicação no ciclo de infecção, e à extremidade 3'UTR uma cauda Poly-A conferindo estabilidade ao mRNA, proteção contra a ação de exonucleases, exportação do RNA a partir do núcleo, além de ser importante para a terminação da transcrição e para a tradução (Figura 1.4) (Adams *et al.*, 2012).

Uma segunda ORF pode ser notada: a PIPO (Pretty Interesting *Potyviridae* ORF) que é também uma proteína. Essa pequena ORF é traduzida, cuja sua expressão codifica a proteína P3N-PIPO que se encontra fusionada no cóstron da P3. A PIPO foi descoberta pela primeira vez em *Turnip mosaic virus* que pertence ao gênero *Potyvirus* (Chung *et al.*, 2008). Essa ORF localiza-se sobreposta na região da poliproteína, que dá origem à proteína P3, sendo expressa e ligada à extremidade N-terminal dessa proteína, gerando um peptídeo cujo peso molecular é de 25kDa (Wen & Hajimorad, 2010).



**Figura 1.4:** Poliproteína característica dos gêneros monopartidos da família *Potyviridae*. O genoma monopartido medindo entre 8-11 kb. Em preto uma pequena ORF denominada PIPO, sobrepõe-se uma região de codificação da poliproteína.

A conformação genômica dentro da família pode ser de duas formas: genoma monopartido e genoma bipartido (Adams *et al.*, 2012). Os gêneros monopartidos, que são a maioria dentro da família, possuem uma partícula que varia de 11-15 nm de diâmetro e 650-900 nm de comprimento e genoma com tamanho entre 8-11 kb (Wylie *et al.*, 2017).

Esse RNA codifica uma poliproteína que é autoclivada com a ação de três proteases (P1-Pro, HC-Pro e NIa-Pro) liberando um conjunto de aproximadamente dez proteínas multifuncionais (P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, Nib e CP). Os gêneros que possuem o genoma monopartido (Figura 1.5) são: *Arepavirus*, *Bevemovirus*, *Celavirus*, *Brambyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus* (Wylie *et al.*, 2017).

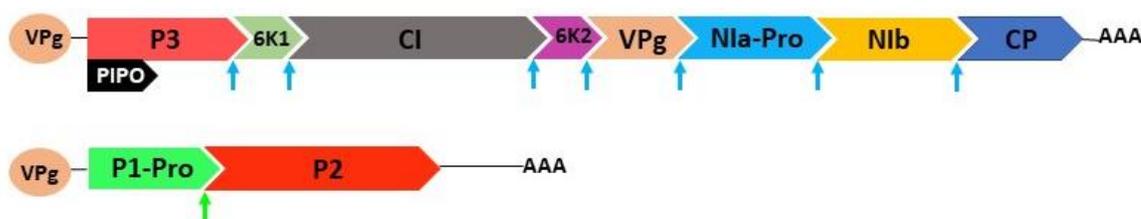


**Figura 1.5:** Organização genômica dos gêneros monopartidos da família *Potyviridae*. Poliproteína com nove sítios de clivagem representados pelas setas coloridas, em que a seta verde representa o sítio da protease P1-Pro, a seta marrom o sítio de HC-Pro e a seta azul os sítios de NIa-Pro. Todos darão origem às dez proteínas multifuncionais.

Na extremidade 3'UTR tem uma cauda poliA e na extremidade 5'UTR possui uma proteína ligada ao genoma, a VPg. Em preto abaixo da P3, a ORF PIPO.

Apenas um gênero possui o genoma bipartido (Figura 1.6) dentro da família, que é o gênero *Bymovirus*. Suas partículas medem de 10-15 nm de diâmetro, 250-300 nm de comprimento (RNA 2) e 500-600 nm de comprimento (RNA 1). Por ter o genoma bipartido, cada partícula encapsida uma molécula distinta de RNA, sendo assim, o genoma possui um RNA 1 que mede de 7,5-8 kb e um RNA 2 que mede 3,5-4 kb (Wylie *et al.*, 2017).

O gênero *Bymovirus* é composto por seis membros, sendo o *Barley yellow mosaic virus* a espécie-tipo que o representa (Chen *et al.*, 1999). Todos os membros possuem apenas duas proteases (NIa-Pro presente no RNA 1 e P1-Pro presente no RNA 2) e 10 proteínas multifuncionais (P3, P3N+PIPO, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb e CP no RNA 1 e P1-Pro e P2 no RNA 2) (Adams *et al.*, 2012).



**Figura 1.6:** Organização genômica da espécie tipo *Barley yellow mosaic virus* do gênero *Bymovirus*. Genoma bipartido com duas poliproteínas que se autoclivam dando origem a 10 proteínas funcionais. Poliproteína do RNA1 com 7 sítios de clivagem da protease NIa-Pro, representados pelas setas azuis e a poliproteína do RNA2 com um sítio de clivagem da protease P1-Pro representado pela seta verde. Nas extremidades 3'UTR têm uma cauda poliA e nas extremidades 5'UTR, há uma proteína ligada ao genoma, a VPg. Em preto abaixo da P3, a PIPO.

Assim como há variações quanto ao tamanho das partículas virais dentro da família, há diferenças genômicas entre os gêneros e entre espécies dentro de um mesmo gênero nos grupos monopartidos (figura 1.7) (Adams *et al.*, 2012). Os gêneros *Potyvirus*, *Poacevirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus* possuem uma organização genômica que é a mais comum dentro da família (figura 1.7-A) (Robaglia *et al.*, 1989; Fellers *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 1999; Stenger *et al.*, 1998).

O gênero *Brambyvirus* composto por uma única espécie (*Blackberry virus Y*) até o momento, possui diferenças significativas em seu genoma que o tornaram um gênero aparte. Uma delas é o fato de possuir o domínio AlkB na proteína P1-Pro que a torna uma das maiores entre as demais dentro da família (figura 1.7-B). Outra característica é a ausência de domínios conservados e a diferença nos sítios de clivagem da poliproteína (Susaimuthu *et al.*, 2008).

No gênero *Ipomovirus*, existem diferenças genômicas entre as espécies que o compõem. Os genomas das espécies *Sweet potato mild mottle virus* (espécie-tipo) e *Tomato mild mottle virus*, são semelhantes aos de alguns *Potyvirus* (figura 1.7-Ca), porém, os motivos que estão presentes nas proteínas HC-Pro e CP dos *Potyvirus* e que são responsáveis pela transmissão por afídeos, estão ausentes nesses *Ipomovirus*, já que estes são transmitidos por mosca branca (Dombrovsky *et al.*, 2014).

Os *Ipomovirus Squash vein yellowing virus* e *Cucumber vein yellowing virus* não possuem a proteína HC-Pro além de uma diferença na proteína P1 que aparece dividida em P1a e P1b (figura 1.7-Cb). A P1a mostra alta identidade com a P1 dos *Potyvirus* transmitidos por afídeos e a P1b mostra alta identidade com a P1 dos *Tritimovirus* carregando funções de silenciamento gênico (Webster & Adkins, 2012).

Já os *Ipomovirus Cassava brown streak virus* e *Ugandan cassava brown streak virus* também não possuem a proteína HC-Pro, além disso, possuem uma proteína diferente, a HAM1h (figura 1.7-Cc) entre as proteínas Nib e CP que ainda não possui suas funções esclarecidas, infere-se que esteja envolvida com a redução das taxas de mutação do RNA viral (Mbanzibwa *et al.*, 2011; Ateka *et al.*, 2017).

As espécies do gênero *Macluravirus* possuem um genoma menor do que os demais potyvirus devido à ausência da proteína P1-Pro. Além disso, no lugar das proteínas 6K1 e 6K2 encontram-se as proteínas 7K e 9K respectivamente (figura 1.7-D), em sítios bem conservados dentro do gênero, mas que possuem suas funções ainda desconhecidas (Kondo & Fujita, 2012; Minutillo *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2018).

Nos últimos 8 anos, quatro novos gêneros foram aceitos como membros da família *Potyvridae*, são eles: *Roymovirus*, *Bevemovirus*, *Arepavirus* e *Celavirus*. As análises filogenéticas e a organização genômica foram as características principais que fizeram com que houvesse essa mudança taxonômica que ocorreu a partir da inserção desses quatro novos gêneros (Mollov *et al.*, 2013; Seo *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Rose *et al.*, 2019).

O gênero *Roymovirus* possui duas espécies aceitas até o momento. As espécies *Rose yellow mosaic virus* (espécie-tipo), e *Passiflora edulis symptomless virus* possuem uma conformação genômica bem próxima a dos membros do gênero *Potyvirus* (figura 1.7-A), com exceção das diferenças em domínios conservados (Mollov *et al.*, 2013; Jover-Gil *et al.*, 2018).

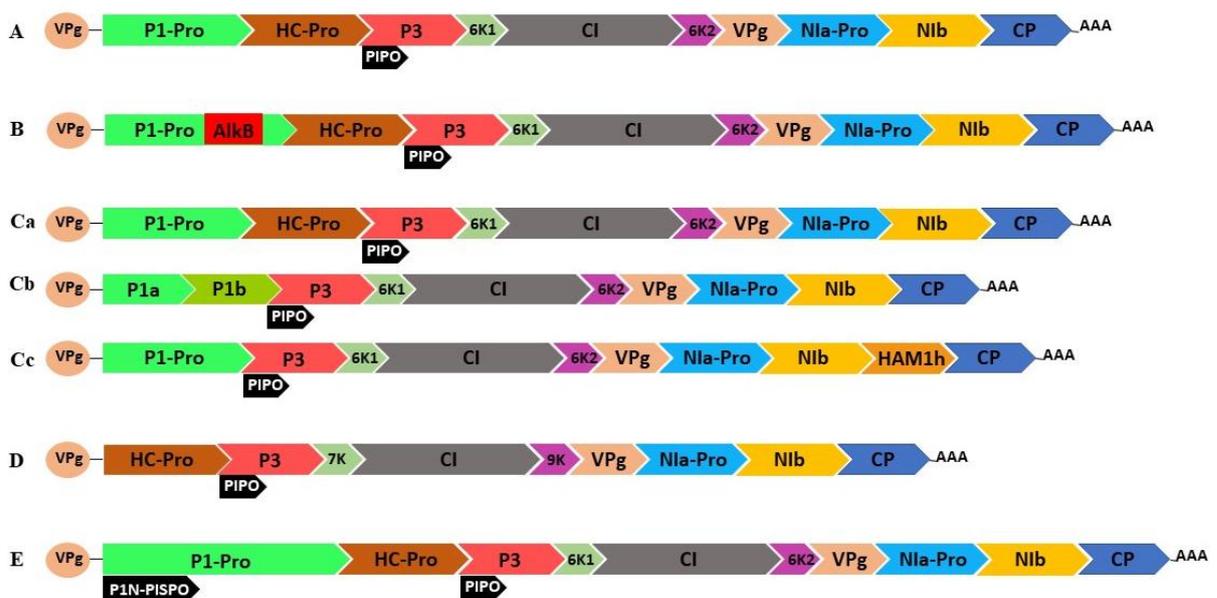
O gênero *Bevemovirus* é composto por uma única espécie que é a *Bellflower veinal mottle virus*. É um gênero que está mais próximo aos *Macluravirus* (figura 1.7-D) com uma organização genômica semelhante. Análises filogenéticas mostraram baixa similaridade na

sequência de aminoácido da poliproteína com relação aos macluravirus e uma baixa similaridade na sequência de nucleotídeo da CP com relação aos bymovirus, reforçando a ideia de um novo gênero dentro da família (Seo *et al.*, 2017).

*Arepavirus* é um gênero que possui duas espécies, *Arepa palm necrotic ringspot virus* e *Arepa palm necrotic spindle-spot virus* (espécie-tipo). Análises filogenéticas revelaram que esse gênero está mais próximo aos *Macluravirus* (figura 1.7-D), além de terem uma organização genômica similar, como a ausência da proteína P1-Pro e a presença das proteínas 7K e 9K entre as proteínas P3 e CI (7K), CI e VPg (9K) (Yang *et al.*, 2018).

Por fim, o gênero *Celavirus* possui até o momento apenas uma espécie (*Celery latent virus*) e uma organização genômica bem próxima a dos *Potyvirus* e *Tritimovirus* (figura 1.7-A), compartilhando inclusive um domínio em comum com os tritimovirus que é o *zinc finger-like* (C2H2), porém, presente na proteína P1-Pro ao invés da HC-Pro. A função desse domínio ainda não é conhecida, mas infere-se que possa estar envolvido com o processo de transmissão (Rose *et al.*, 2019).

Dentre os vírus do gênero *Potyvirus* que infectam batata-doce, existe um grupo monofilético composto pelas espécies *Sweet potato feathery mottle virus*, *Sweet potato virus C*, *Sweet potato virus G* e *Sweet potato virus 2* que codificam a maior proteína P1 entre todos os potyvirus já relatados, devido a presença de uma pequena ORF denominada PISPO (P1N-PISPO) que encontra-se sobreposta à poliproteína, na região que origina a P1-Pro fusionada à sua extremidade N-terminal onde é expressa e gerando um peptídeo (figura 1.7-E) (Untiveros *et al.*, 2016).



**Figura 1.7:** Representação esquemática de algumas variações genômicas entre os gêneros monopartidos da família *Potyviridae*. A) Organização genômica dos gêneros *Celavirus*, *Potyvirus*, *Poacevirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*. B) Organização genômica de um *Brambyvirus* em que a P1-Pro é maior do que o normal devido a presença do domínio AlkB. C) Organização genômica do gênero *Ipomovirus* onde há três diferenças entre espécies desse gênero: Ca) Organização genômica das espécies *Sweet potato mild mottle virus* e *Tomato mild mottle virus* assim como dos gêneros em A). Cb) Organização genômica das espécies *Squash vein yellowing virus* e *Cucumber vein yellowing virus* onde é possível ver a P1 dividida em duas (P1a e P1b) e a ausência da HC-Pro. Cc) Organização genômica das espécies *Cassava brown streak virus* e *Uganda cassava brown streak virus* com a HC-Pro ausente e um domínio HAM1h entre as proteínas NIb e CP. D) Organização genômica dos *Macluravirus* e *Bevemovirus* em que é possível perceber a ausência da proteína P1-Pro e presença de duas outras proteínas 7K e 9K. E) Organização genômica de um grupo monofilético dentro do gênero *Potyvirus* composto pelas espécies *Sweet potato feathery mottle virus*, *Sweet potato virus C*, *Sweet potato virus G*, *Sweet potato virus 2* e *Sweet potato latent virus* onde é possível ver a presença de uma terceira ORF a PISPO.

Além das diferentes conformações genômicas dentro da família *Potyviridae*, as funções que as proteínas exercem também são variáveis. Isso ocorre, devido as atividades que elas executam dentro do ciclo de infecção estarem relacionadas não só com diferentes funções, como também por ocorrerem de forma interdependente e estabelecendo ligações com as proteínas da hospedeira (Elena & Rodrigo, 2012).

### 1.5.2 Eventos de recombinação

Em geral, os vírus de planta usam diversos mecanismos com o intuito de gerar variabilidade genética. Dentre todos os mecanismos existentes, a recombinação pode ser o mais importante, já que acelera a evolução viral por meio das combinações genômicas. Recombinação nada mais é do que a troca de fragmentos do genoma entre vírus distintos durante infecções mistas. O evento de recombinação pode causar mudanças genéticas nas propriedades biológicas dos vírus (Desbiez *et al.*, 2011).

Esses eventos entre RNAs genômicos de potyvirus, têm sido relatados em isolados naturais há muito tempo, mostrando assim, um papel importante na evolução desse grupo (Cervera *et al.*, 1993; Revers *et al.*, 1996). Há também estudos que mostram o quanto algumas populações de potyvirus podem ser mais propensas à ocorrência de recombinação do que outras (Desbiez *et al.*, 2011). Por causa do grande número de eventos de recombinação em alguns grupos de espécies, o esperado é que a capacidade de adaptação deles seja alta (Lefevre *et al.*, 2009).

Ainda não se sabe ao certo quais são os fatores que facilitam a ocorrência da recombinação, porém existem algumas possibilidades como a troca da fita molde pela replicase viral durante a etapa de replicação, o término precoce da síntese de RNA ou o efeito de alguns fatores virais e do hospedeiro. Outros estudos, relatam evidências de que a recombinação pode

estar envolvida com a ampliação da gama de hospedeiras ou até mesmo com a suplantação da resistência genética de plantas (Feng *et al.*, 2014).

A recombinação dificulta as análises filogenéticas, pois várias regiões do genoma em um único indivíduo podem ter diferentes histórias evolutivas. Ela também pode impedir a detecção de vírus por PCR convencional ou através de técnicas sorológicas como ELISA, apresentando falsos negativos devido ao aumento da variação genômica (Braidwood *et al.*, 2019). Portanto, para identificar espécies de vírus de RNA, foram desenvolvidos oligonucleotídeos com sequências degeneradas visando amplificar locais conservados a nível de gênero (Zheng *et al.*, 2008).

Estudos mostram que algumas regiões dos genomas virais estão naturalmente mais propensas aos eventos de recombinação (*hotspots*), enquanto outras regiões são pouco propensas (*coldspots*) (Braidwood *et al.*, 2019). A alta variabilidade das populações virais dificulta medidas de controle consideradas eficazes contra doenças de etiologia viral como o uso de variedades resistentes, já que essa alta variabilidade ameaça a durabilidade da resistência genética (Herrera *et al.*, 2018).

### **1.5.3 A ação das proteases e os sítios de clivagem**

Para se propagar na célula hospedeira, os vírus geram proteínas multifuncionais a partir do seu genoma que é relativamente pequeno e fazem isso se apropriando da maquinaria de tradução da célula hospedeira (Sicard *et al.*, 2016). Porém, os vírus de RNA ao infectarem as células eucarióticas hospedeiras, acabam encontrando dificuldades para a produção de suas múltiplas proteínas (Goh & Hahn, 2021).

Para superar esse obstáculo, algumas estratégias foram desenvolvidas por eles como forma de gerar várias proteínas a partir de uma única fita de mRNA. No caso dos potyvirus, eles possuem um mecanismo chamado *frameshifting* que os permite usar várias fases de leitura do seu genoma. Dessa forma, a poliproteína traduzida a partir de um único genoma de RNA será processada após uma clivagem proteolítica (Merits *et al.*, 2002).

P1-Pro, HC-Pro e NIa-Pro são as proteases envolvidas no processo dos sítios de clivagem presentes na poliproteína. Cada uma reconhece uma sequência consenso específica na poliproteína próxima ao local de clivagem (tabela 1.1) (Goh & Hahn, 2021). As análises da estrutura genômica demonstram que as sequências de nucleotídeos (nt) e de aminoácidos (aa) das proteínas funcionais são conservadas entre as espécies (Wylie *et al.*, 2017).

A P1 (*proteínase 1*) é a primeira proteína do genoma e a mais variável dentro da família *Potyviridae*, tanto em tamanho quanto em organização genômica. Entretanto, ela possui alguns domínios conservados. Essa proteína é uma serina protease que apresenta uma tríade catalítica em histidina, ácido aspártico e serina sendo bem conservada na região C-terminal: HX<sub>8</sub>-(D,E)-X<sub>28-31</sub>-G-X-S (tabela 1.1). Dependendo do gênero, esse sítio ativo pode ser formado com uma distância maior entre D e S (Rohozková & Navrátil, 2011).

Já a HC-Pro, vem logo após a P1 e é uma proteinase com ação de translocação co-traducional com o sítio de clivagem entre um dipeptídeo glicina (G/G) na região C-terminal da proteína. Estudos adicionais definiram a sequência de clivagem em torno do dipeptídeo glicina como sendo YXVG/G (tabela 1.1) (Valli *et al.*, 2018). No lugar do “X” os aminoácidos podem variar conforme o gênero segundo regra da IUPAC (*International Union of Pure Applied Chemistry*) (Adams *et al.*, 2005).

A NIa é uma proteinase que consiste em dois domínios: proteína viral ligada ao genoma (VPg) e protease (NIa-Pro) que são separados por um sítio auto-proteolítico (Adams *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2020). Quanto aos outros sítios de clivagem é possível notar sete locais diferentes onde eles ocorrem. Apesar de serem processados pela mesma protease, a NIa-Pro demonstra preferência por aminoácidos distintos trazendo variações entre esses sítios, de acordo com a organização genômica e o gênero (tabela 1.1) (Goh & Hahn, 2021).

**Tabela 1.1:** Sítios de clivagem e proteínas presentes nas poliproteínas de representantes de cada gênero dentro da família *Potyviridae* (Adams *et al.*, 2005).

Acrônimo*	Proteínas presentes e os sítios de clivagem de acordo com a organização genômica								
	P1-Pro/HC-Pro	HC-Pro/P3	P3/6K1	6K1/CI	CI/6K2	6K2/VPg	VPg/N1a-Pro	N1a-Pro/N1b	N1b/CP
PVY	F/S	G/G	Q/R	Q/S	Q/A	Q/G	E/A	Q/A	Q/A
RgMV	Y/S	G/G	Q/A	Q/S	Q/S	E/G	E/S	Q/S	E/A
BVY	Y/S	G/G	Q/S	Q/A	Q/N	E/A	E/G	Q/N	A/L
CeLV	●X/S	●X/G	L/N	S/G	●X/X	●X/X	●X/X	Q/E	Q/S
SPMMV	Y/A	G/G	H/G	H/G	H/G	H/G	H/G	H/G	H/G
TriMV	Y/S	G/G	H/A	H/A	H/G	H/G	H/S	H/N	H/S
WSMV	Y/G	G/G	Q/G	Q/S	Q/A	E/G	E/G	Q/S	E/S
RoYMV	Y/S	G/G	G/S	S/A	E/G	E/F	E/Q	Q/G	Q/M
		HC-Pro/P3	P3/7K	7K/CI	CI/9K	9K/VPg	VPg/N1a-Pro	N1a-Pro/N1b	N1b/CP
APSSNV	-	G/G	Q/S	Q/A	Q/S	E/V	E/C	Q/M	Q/M
BVMoV	-	D/A	Q/A	Q/G	Q/M	E/G	E/M	Q/A	Q/I
ChYNMV	-	G/A	Q/A	Q/M	Q/A	E/M	E/M	Q/M	Q/M
	P1/P2◇	HC-Pro/P3	P3/6K1	6K1/CI	CI/6K2	6K2/VPg	VPg/N1a-Pro	N1a-Pro/N1b	N1b/CP
BaYMV	G/A	-	Q/A	Q/A	Q/A	E/G	E/A	Q/A	Q/A

(\*) → Acrônimos das espécies-tipo de cada gênero dentro da família *Potyviridae*: *Potato virus Y- Potyvirus* (PVY); *Ryegrass mosaic virus- Rymovirus* (RgMV); *Blackberry virus Y- Brambyvirus* (BVY); *Celery latente virus- Celavirus* (CeLV); *Sweet potato mild mottle virus- Ipomovirus* (SPMMV); *Triticum mosaic virus- Poacevirus* (TriMV); *Wheat streak mosaic virus- Tritimovirus* (TriMV); *Arepa palm necrotic spidle-spot virus- Arepavirus* (ANSSV); *Bellflower veinal mottle virus- Bevemovirus* (BVMoV); *Chinese yam necrotic mosaic virus- Macluravirus* (ChYNMV); *Rose yellow mosaic virus- Roymovirus* (RoYMV); e *Barley yellow mosaic virus- Bymovirus* (BaYMV). (●) → Sítios de clivagem não confirmados: A letra X representa a presença de qualquer aminoácido. (-) → Proteínas ausentes: Proteínas ausentes: P1-Pro em ASSNV, BVMoV e ChYNMV. (◇) → Proteínas presentes apenas no RNA 2 do BaYMV, representante do único grupo bipartido (*Bymovirus*) dentro da família *Potyviridae*.

#### 1.5.4 Funções das proteínas dos potyvirus dentro do ciclo de infecção

Após a clivagem da poliproteína com a ação das três proteases (P1-Pro, HC-Pro e NIa-Pro), proteínas multifuncionais são liberadas e desempenharão papéis fundamentais dentro do ciclo de infecção viral: proteinase 1 (*proteinase 1- P1*), proteinase componente auxiliar (*Helper Component Proteinase- HC-Pro*), proteína 3 (*protein 3- P3*), peptídeo 6 kilodalton 1 (*peptide 6kDa 1- 6K1*), proteína de inclusão cilíndrica (*Cylindrical inclusion- CI*), peptídeo 6 kilodalton 2 (*peptide 6kDa 2- 6K2*), proteína viral ligada ao genoma (*Viral Protein genome-linked- VPg*), proteinase de inclusão nuclear-a (*Nuclear Inclusion a- NIa-Pro*), proteína de inclusão nuclear-b (*Nuclear Inclusion b- NIb*) e a proteína do capsídeo (*capside protein- CP*) (Revers & Garcia, 2015; Wylie *et al.*, 2017).

A proteinase P1 (tabela 1.2) é a mais variável quanto ao tamanho e sequência, mas apesar disso, apresenta domínios conservados na região C-terminal. Possui clivagem em *cis* que libera ela mesma. Apresenta funções relacionadas com a replicação, supressão do silenciamento gênico e transmissão por vetor (Rohozková & Navrátil, 2011). Pode ter diferentes classificações (tipo A e tipo B) que se baseiam em análises filogenéticas e ponto isoelétrico (Rodamilans *et al.*, 2013). Os domínios N-terminal e C-terminal dessa proteína, apresentam papel relevante com fatores de interação da hospedeira (Shan *et al.*, 2018). Além disso, está envolvida com a amplificação do genoma, influencia na infectividade e sintomatologia (Rohozková & Navrátil, 2011; Magliogka *et al.*, 2012; Pasin *et al.*, 2014).

Estudos com *Tobacco etch virus* (TEV) mostraram que a P1 é capaz de interagir com ribossomos citoplasmáticos da hospedeira se ligando às subunidades durante o processo de infecção, isso mostra que essa proteína é capaz de se movimentar do citoplasma para o núcleo durante o ciclo infeccioso desse vírus (Martínez & Daròs, 2014). Rodamilans *et al.* (2015) realizaram uma caracterização da P1 em *Sweet potato feathery mottle virus*, foi encontrada uma outra ORF, a P1N-PISPO. A P1N-PISPO apresenta atividade de supressão de silenciamento de RNA (RSS) e está presente em outros *Potyvirus* como: *Sweet potato virus C*, *Sweet potato virus G* e *Sweet potato virus 2* (Mingot *et al.*, 2016; Untiveros *et al.*, 2016).

A proteinase HC-Pro (tabela 1.2) (*Helper Component Proteinase*) ganhou esse nome devido a sua primeira função descoberta: uma proteína que age como componente auxiliar na transmissão por afídeos, isso a tornou a proteína mais estudada dentro da família. A partir desses diversos estudos, outras funções foram descobertas, principalmente as relacionadas com a supressão do silenciamento gênico interagindo com pequenos e longos RNAs (Ivanov *et al.*, 2016; Valli *et al.*, 2018). É capaz de interagir com diversas proteínas da hospedeira, porém a importância funcional dessas interações ainda é pouco estudada (Del Toro *et al.*, 2014). Além

disso, a HC-Pro também interage com proteínas virais como P1 (Rohozková & Navrátil, 2011), VPg (Ala-Poikela *et al.*, 2011) e CP (Zilian & Maiss, 2011).

A HC-Pro possui domínios funcionais altamente conservados como o FRNK (fenilalanina-F, arginina-R, asparagina-N e lisina-K) conhecido por seu papel na supressão de silenciamento gênico (Shiboleth *et al.*, 2007). Ensaios de expressão transiente mostraram que o resíduo de asparagina (N) presente nesse domínio é importante para regulação de mecanismos de silenciamento gênico, além de ser necessário para a manutenção da localização subcelular da proteína contribuindo com sua multifuncionalidade, mostrando ter sido indispensável para o ciclo de infecção ao longo da evolução dos potyvirus (Sahana *et al.*, 2014). A HC-Pro possui três domínios estruturais distintos: a região N-terminal responsável pelas funções de interação vírus/vetor, a região central responsável pelas atividades de silenciamento gênico e a região C-terminal relacionada com a atividade proteolítica (Plisson *et al.*, 2003)

A proteína P3 (tabela 1.2) não possui sua função bioquímica bem caracterizada, porém, o pouco que se sabe é que ela está envolvida com o processo de replicação dos vírus e patogenicidade (Wen *et al.*, 2011; Luan *et al.*, 2016). É uma proteína que interage com outras proteínas de potyvirus (CI, NIa-Pro e NIb), mas essas interações ainda não são o suficiente para fornecer informações consistentes sobre as funções da P3 (Zilian & Maiss, 2011). Uma segunda ORF altamente conservada foi identificada pela primeira vez no cístron da P3 em *Turnip mosaic virus* por Chung *et al.*, 2008 e nomeada como PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae* ORF). Até o momento, o que se sabe é que a PIPO (tabela 1.2) está relacionada com as atividades de movimento viral (Wen & Hajumrad, 2010).

A proteína 6K1 (tabela 1.2) ainda não possui seu papel funcional bem definido, porém, um estudo feito com a 6K1 do potyvirus *Plum pox virus*, mostrou que ela é necessária para a replicação viral como elemento importante do complexo de replicação no estágio inicial da infecção (Cui & Wang, 2016). A proteína CI (tabela 1.2) é responsável pela formação de corpos de inclusão citoplasmática, possui função ATPase/RNA helicase e participa do movimento célula-célula (Sorel *et al.*, 2014). Como parte do complexo de replicação viral, auxilia na replicação do genoma e quanto ao movimento célula-célula provavelmente através de plasmodesma interagindo com a CP (Deng *et al.*, 2015). A proteína 6K2 (tabela 1.2) está envolvida com a ligação do complexo viral de replicação do genoma e assim como a P3, ela também está relacionada com a patogenicidade (Geng *et al.*, 2016).

A proteína VPg (tabela 1.2) é multifuncional e interage com diversas proteínas de potyvirus, participando do processo de tradução e interagindo com fatores eIF4E da hospedeira

(Elena & Rodrigo, 2012). Está envolvida no processo de replicação viral do RNA funcionando como um precursor desse processo, além de exercer atividades de supressora do silenciamento gênico, movimentos célula-célula e movimento sistêmico (Revers & Garcia, 2015; Cheng & Wang, 2017). A NIa (tabela 1.2) é uma proteína que forma inclusões nucleares cristalinas e que também interage com proteínas virais e várias outras da hospedeira (Gao *et al.*, 2012). NIa-Pro é o domínio protease que se encarrega da ação proteolítica de sete regiões da poliproteína (Adams *et al.*, 2005). Essa variação dos diferentes sítios de clivagem, não só é eficiente como sugere que a maturação das proteínas virais que ocorre após a ação proteolítica, é perfeitamente regulada e desempenha papel importante no controle de infecção desses vírus (Sun *et al.*, 2010).

A NIb (tabela 1.2) assim como a NIa é uma proteína que forma inclusões nucleares cristalinas e é a RNA polimerase dependente de RNA (RpRd), responsável pelo processo de replicação do genoma dos potyvirus (Revers & Garcia, 2015). Acredita-se que essa proteína é direcionada para estruturas celulares membranosas onde interage com as proteínas 6K2, VPg e NIa-Pro. Para que ocorra a replicação viral, ela também interage com proteínas hospedeiras (Shen *et al.*, 2020). A CP (tabela 1.2) é a proteína responsável pela encapsidação do genoma viral, amplificação, movimento e transmissão (Adams *et al.*, 2012). A região N-terminal se encontra na superfície da partícula viral, a região central é altamente conservada e responsável pela montagem dos *virions*, por fim, a região C-terminal, também altamente conservada, está envolvida com a transmissão (Seo *et al.*, 2013).

Algumas proteínas estão presentes em gêneros específicos, a exemplo disso, as proteínas 7K (*peptide 7 kDa*) e 9K (*peptide 9kDa*) (tabela 1.2) que são encontradas nos genomas dos *Macluravirus*, *Bevemovirus* e *Arepavirus* em regiões altamente conservadas (Kondo & Fujita, 2012; Seo *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). As funções dessas proteínas são desconhecidas (Adams *et al.*, 2012), infere-se que estejam relacionadas com as atividades de replicação viral assim como as proteínas 6K1 e 6K2 dos demais potyvirus (Cui & Wang, 2016; Geng *et al.*, 2016). Outra proteína que pode ser vista em um gênero específico é a proteína P2 (*protein 2*) (tabela 1.2) juntamente com a proteína P1 codificadas pelo RNA 2 dos *Bymovirus* (Adams *et al.*, 2012). A proteína P2 possui sua função ainda pouco conhecida, mas um estudo revelou que ela mostrou ser essencial para a infecção sistêmica (You & Shirak, 2010).

**Tabela 1.2:** Proteínas produzidas pelos membros da família *Potyviridae* e suas características multifuncionais.

<b>Proteínas</b>	<b>Funções</b>	<b>Massa Molecular (kDa)</b>	<b>Referências</b>
<b>P1-Pro</b>	Protease, sintomatologia, amplificação do genoma, ativadora e/ou reguladora da replicação, além de estar envolvida na infectividade e acúmulo viral.	32-64	Rohosková & Navrátil, 2011; Magliogka <i>et al.</i> , 2012; Rodamilans <i>et al.</i> , 2013; Pasin <i>et al.</i> , 2014; Shan <i>et al.</i> , 2018
<b>P1N+PISPO</b>	Supressão do silenciamento gênico	70-72	Mingot <i>et al.</i> , 2016
<b>HC-Pro</b>	Protease, transmissão do vetor, movimento sistêmico e supressão do silenciamento gênico.	56-58	Ivanov <i>et al.</i> , 2016; Valli <i>et al.</i> , 2018
<b>P3</b>	Patogenicidade e replicação do genoma.	38-40	Wen <i>et al.</i> , 2011; Luan <i>et al.</i> , 2016
<b>P3N+PIPO</b>	Movimento a longa distância.	25	Wen & Hajumrad, 2010
<b>6K1</b>	Relacionada com a severidade dos sintomas (em conjunto com a P3) e adaptação com a hospedeira (em conjunto com a CI).	6	Cui & Wang, 2016
<b>CI</b>	Formação de corpos de inclusão citoplasmática, movimento célula-a-célula e função ATPase/RNA helicase.	70	Sorel <i>et al.</i> , 2014; Deng <i>et al.</i> , 2015
<b>6K2</b>	Ancoragem do complexo de replicação a membranas (indução de vesículas de replicação).	6	Geng <i>et al.</i> , 2016
<b>VPg</b>	Atua como um iniciador da replicação ao interagir com fatores de tradução da hospedeira e também como supressora do silenciamento gênico.	21-24	Elena & Rodrigo, 2012; Revers & Garcia, 2015; Cheng & Wang, 2017
<b>N1a-Pro</b>	Interação entre proteínas virais e proteínas da hospedeira.	49	Gao <i>et al.</i> , 2012
<b>N1b</b>	Formação de corpos de inclusão nuclear, RNA polimerase dependente de RNA e replicação viral.	58	Revers & Garcia, 2015; Shen <i>et al.</i> , 2020
<b>CP</b>	Movimento viral, amplificação do genoma, encapsidação e transmissão do vetor.	28-40	Adams <i>et al.</i> , 2012; Seo <i>et al.</i> , 2013
<b>P2</b>	Infecção sistêmica	70-75	You & Shirak, 2010
<b>7K e 9K</b>	Função pouco conhecida, infere-se que tenham as mesmas funções que 6K1 e 6K2. Possuem sequências altamente conservadas	7 e 9 (respectivamente)	Kondo & Fujita, 2012; Seo <i>et al.</i> , 2017; Yang <i>et al.</i> , 2018

### 1.5.5 Ciclo de infecção: replicação e movimento viral

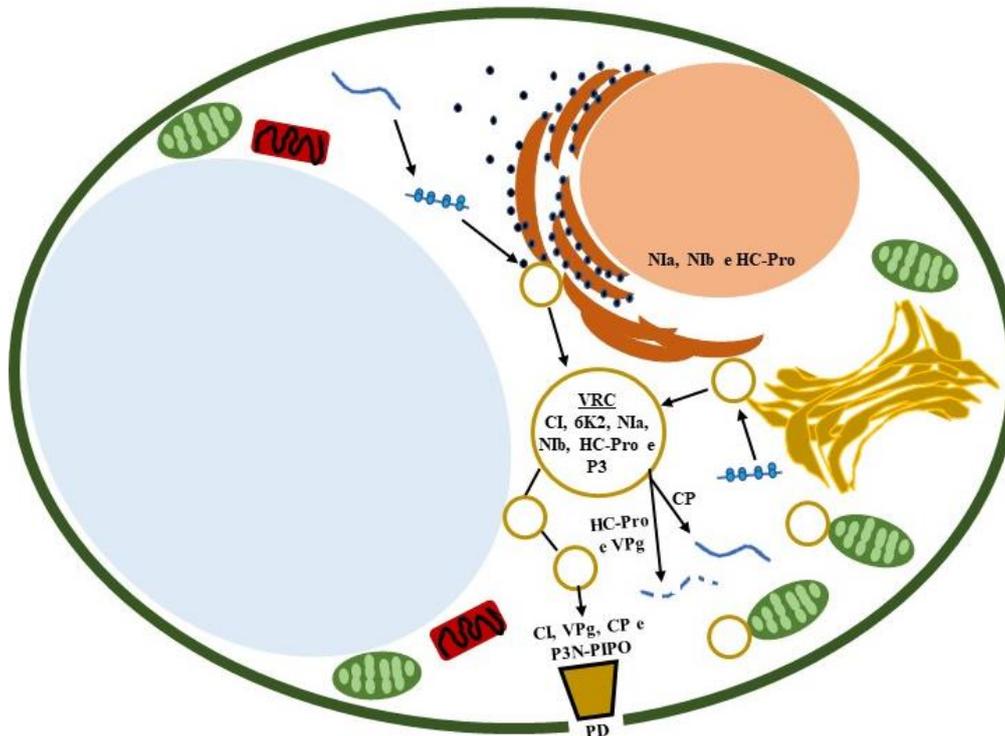
De modo geral, os vírus de RNA senso positivo possuem o mesmo processo de replicação que se inicia logo após sua entrada na célula. Imediatamente o RNA é desencapsidado, o genoma é exposto, os genes são reconhecidos e traduzidos pelo processo de síntese com o auxílio de componentes da própria célula hospedeira (ribossomos, tRNAs e aminoácidos) (Ivanov *et al.*, 2014). Tanto a síntese do RNA viral, quanto a tradução são processos que se correlacionam, no entanto, os mecanismos de interação e regulação que ocorrem precisam ser estudados (Revers & García, 2015).

As proteínas virais envolvidas na replicação unem o RNA viral às proteínas da célula hospedeira, dando origem a um complexo replicativo que se associa às proteínas de membrana celulares (figura 1.8). Esse complexo produzirá fitas de RNA complementares à fita do RNA viral que por fim será encapsidada dando origem às novas partículas virais (Ivanov *et al.*, 2014). As proteínas P3, CI, 6K2, VPg, NIa e NIB estão envolvidas no processo de replicação viral e o início desse processo se dá através da proteína 6K2 a partir da formação de vesículas (Wei *et al.*, 2010).

Após isso, a P3 se associa às vesículas que foram produzidas pela 6K2 para iniciar a formação do complexo replicativo. Depois a NIB atuará como RpRd (Shen *et al.*, 2020), as proteínas VPg e NIa vão interagir com a NIB auxiliando em uma melhor atividade dessa proteína (Elena & Rodrigo, 2012; Gao *et al.*, 2012) e a CI como helicase desnaturando regiões de fita dupla (Sorel *et al.*, 2014). Há evidências de que a proteína HC-Pro também esteja envolvida com essa etapa de replicação viral, já que ela interage tanto com as proteínas virais VPg e CI, quanto com as proteínas efetoras da hospedeira (Ala-Poikela *et al.*, 2011).

Dessa forma, um complexo replicativo é formado onde vesículas se ancoram às membranas do retículo endoplasmático com o auxílio de componentes celulares sequestrados da via excretora. Após isso, as vesículas virais são levadas ao longo de filamentos de actina em direção à parede celular e ao plasmodesma onde serão transportadas para células vizinhas (figura 1.8). Infere-se que essa movimentação via plasmodesmas ocorre com o auxílio de pelo menos cinco proteínas específicas para o movimento e que são codificadas pelo próprio vírus (Ivanov *et al.*, 2014).

As proteínas HC-Pro, P3N-PIPO, CI e CP estão envolvidas com o movimento célula-célula dentro do ciclo de infecção dos potyvirus. Agem aumentando o limite de exclusão do plasmodesma, facilitando o movimento do vírus (figura 1.8) (Wen & Hajumrad, 2010; Deng *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2014; Valli *et al.*, 2018). Em alguns casos, a P1 também pode estar envolvida nesse processo (Martínez & Daròs, 2014).



**Figura 1.8: Representação esquemática do ciclo de infecção viral na célula hospedeira- replicação e movimento virais.** O vírus entra na célula hospedeira, ocorre a desencapsidação e o RNA genômico é traduzido pelo ribossomo da hospedeira. Os potyvirus montam seus complexos de replicação (VRCs) e as vesículas virais são transportadas ao longo de filamentos de actina em direção a parede celular e ao plasmodesma (PD). Nas fases posteriores da infecção, as vesículas se fundem com membranas dos cloroplastos formando estruturas perinucleares e as proteínas CI, VPg, CP e P3N-PIPO, participam do movimento célula-célula.

### 1.5.6 Mecanismo de supressão do silenciamento gênico

A regulação da expressão gênica é mediada através do evento de silenciamento gênico que ocorre por meio do reconhecimento específico de sequências transcritas de RNA. É um mecanismo importante pois está envolvido com a manutenção do genoma e defesa da planta. Porém, os vírus, além de alvo também são indutores de silenciamento, sendo isso associado à sintomatologia nas plantas (Daros, 2017).

Há três processos de silenciamento: o silenciamento gênico pós-transcricional (*posttranscriptional gene silencing, PTGS*), o silenciamento gênico que é mediado por micro RNAs (*miRNA*) e o silenciamento gênico transcricional (*transcriptional gene silencing, TGS*), sendo que o PTGS é um sistema bastante refinado e ativado durante a regulação da expressão de genes da hospedeira (Wang *et al.*, 2012; Kamthan *et al.*, 2015).

A degradação de ssRNA e mRNA é promovida pelo mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Esse mecanismo é ativado pela presença de dsRNA que são produzidos por vírus de RNA durante o processo de replicação. Essas moléculas servem de molde para as enzimas RNA polimerase RNA dependente (Dalakouras *et al.*, 2018).

Em seguida, RNAses do tipo III, conhecidas como Dicer (DCL), atuam clivando os dsRNAs em fragmentos menores que variam de 21 a 25 nt. Dessa forma, são gerados siRNAs que atuam como moldes para a degradação de mRNAs em um complexo de silenciamento ribonucleoproteico denominado RISC (*RNA induced silencing complex*), com a participação de proteínas argonautas (AGO) (Fang & Qi, 2016).

Um processo denominado *virus-induced gene silencing* (VIGS) gera e dispara pequenos RNAs que são derivados do genoma viral chamados *virus-derived small RNA* (vsRNA). Esses vsRNAs são processados pelo complexo RISC e degradam mRNAs específicos gerando um sinal que é propagado célula-célula através dos plasmodesmas e via floema, ou seja, garantindo uma distribuição sistêmica do processo (Lange *et al.*, 2013).

De todas essas atividades de silenciamento, as que têm gerado resultados mais eficientes é o emprego de uma estrutura de RNA em grampo conhecido como *hairpin RNA* (hpRNA). (Dalakouras *et al.*, 2018). Mesmo em meio a todas essas estratégias, muitos vírus conseguem vencer esses obstáculos por meio da expressão de proteínas supressoras de silenciamento, que ajudam a inibir esses processos e garantem o sucesso da infecção (Rohozková & Navrátil, 2011; Elena & Rodrigo, 2012; Sahana *et al.*, 2014; Mingot *et al.*, 2016).

### **1.5.7 Transmissão e vetores**

A transmissão de vírus de planta é uma etapa que antecede os processos de replicação e movimento virais que ocorre dentro da hospedeira. Com o auxílio de diferentes organismos vetores, os vírus de planta (fitovírus) são disseminados na natureza (Fajardo & Nickel, 2019). Esses vetores podem ser nematoides, fungos, protozoários de solos e insetos, sendo esses últimos os responsáveis pela maioria das transmissões de fitovírus. O processo de transmissão dos vírus de plantas divide-se basicamente em dois tipos: não-persistente e circulativa (Revers & Garcia, 2015).

A forma não-persistente consiste quando o vírus adere ao aparelho bucal do inseto sugador (estilete), após isso é transmitido por picada de prova. Na forma circulativa, o vírus é ingerido pelo vetor, circula pelo organismo dele. Quando o vírus circula pelo corpo do inseto e não se multiplica, dá-se o nome de persistente sendo circulativa não-propagativa. A transmissão pode ocorrer por vários dias ou semanas após o vírus ser adquirido pelo vetor (Pereira-Carvalho *et al.*, 2015).

Quando o vírus se mantém no corpo do vetor e se replica, ele passa a se tornar virulífero por toda a vida, sendo essa uma relação do tipo persistente circulativa propagativa. Há também

uma relação intermediária que é a semi-persistente, onde a aquisição do vírus pelo inseto é mais lenta, necessitando de minutos a horas de aquisição e após isso, podendo ficar retido por horas e até mesmo dias no aparelho bucal do inseto (Pereira-Carvalho *et al.*, 2015).

Dentro da família *Potyviridae*, cada gênero é transmitido por uma espécie diferente desses organismos, inclusive esse é um dos critérios taxonômicos que define um novo gênero dentro da família. Dos doze gêneros existentes, cinco são transmitidos por insetos (afídeos, ácaros e moscas brancas) e apenas um gênero transmitido por protozoário de solo (plasmódioforomiceto). A relação de transmissão que ocorre dentro da família pode ser não-persistente ou semi-persistente (Wylie *et al.*, 2017).

Os gêneros *Macluravirus* e *Potyvirus* são transmitidos por diferentes espécies de afídeos de forma não-persistente. Os gêneros *Poacevirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus* são transmitidos por diferentes espécies de ácaros de forma semi-persistente. Os *Rymovirus*, por exemplo, são transmitidos pelos ácaros da espécie *Abacarus hystrix* enquanto os *Poacevirus* e *Tritimovirus* são transmitidos pelos ácaros da espécie *Aceria tosichella* (Koch *et al.*, 2010).

Os membros do gênero *Ipomovirus* são transmitidos por mosca branca de maneira semi-persistente (Dombrovsky *et al.*, 2014). O gênero *Bymovirus* é transmitido de forma não-persistente pelo protozoário de solo *Polymyxa graminis* que é um parasita intracelular obrigatório que infecta raízes de gramíneas (Biancard & Tamada, 2016). O vetor transmite através de seus zoósporos móveis biflagelados e que penetram na planta através dos pelos radiculares, levando o vírus de uma planta para outra (Tyagi *et al.*, 2016).

Existem diversas outras formas de transmissão, por exemplo por meio de aberturas durante operações culturais (poda), outra forma é através de uma pequena quantidade de vírus que pode ser transmitida do pólen para a semente e através de propagação vegetativa a partir de material vegetal contaminado (Mishra *et al.*, 2013). A maioria dos vírus de plantas precisam de insetos vetores para que a transmissão ocorra e o comportamento alimentar deles possui características ecológicas e evolutivas importantes que interferem no sucesso da transmissão (Stafford *et al.*, 2012).

A aquisição do vetor a um vírus de planta, pode alterar diretamente no comportamento de seleção do hospedeiro por seu inseto vetor, ou seja, os fitovírus interagem com a planta em diversos níveis celulares podendo causar mudanças de comportamento da hospedeira acarretando uma transmissão íntima. Há relatos de que esse processo pode ocorrer também entre fitovírus e inseto vetor, ou seja, influenciando o comportamento não só da hospedeira como também do vetor (Ingwell *et al.*, 2012).

Dentro dos gêneros *Macluravirus* e *Potyvirus* tanto o processo de transmissão, quanto o movimento de longa distância só são possíveis devido a interação de duas proteínas virais: HC-Pro e CP (Mishra *et al.*, 2013). No caso do gênero *Ipomovirus* não se sabe ao certo se a HC-Pro está envolvida com a transmissão semi-persistente por mosca branca, já que os motivos responsáveis por essa relação (FRNK) estão ausentes nessa proteína (Shiboleth *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2010).

Nos gêneros *Rymovirus* e *Tritimovirus*, a proteína HC-Pro possui o motivo C2H2 (*zinc finger-like*), um componente fundamental para a transmissão desses vírus por ácaros (Koch *et al.*, 2010), assim como a região N-terminal da proteína CP (Tatineni *et al.*, 2018). Em alguns membros do gênero *Poacevirus* há algumas diferenças no motivo C2H2 presente na proteína HC-Pro, uma evidência de que dentro do mesmo gênero há diferentes formas de interação entre proteínas virais/vetor (Wylie *et al.*, 2012).

Conhecer o vetor de transmissão e a relação que ele estabelece com a hospedeira é importante para estudos de epidemiologia e interação planta/patógeno, assim como saber quais são as proteínas que estão envolvidas dentro do processo de interação entre vírus/vetor também são importantes para esses estudos. Tudo isso é essencial para traçar estratégias de controle, principalmente porque a medida de controle a ser adotada vai variar com o tipo de relação que ocorrerá durante o processo de transmissão (Petersen *et al.*, 2019).

### **1.5.8 Sintomatologia, diagnose e controle de potyvirus**

Diagnosticar doenças de etiologia viral de forma adequada, seja qual for a cultura, é muito importante para uma correta caracterização que será fundamental para estabelecer medidas de controle eficazes (Revers & García, 2015). Os sintomas mais comuns causados por potyvirus variam muito entre clorose, enrugamento foliar, mosaico, mosqueado, nanismo, necrose etc., porém, em alguns casos as plantas ficam assintomáticas e muitas vezes os sintomas são confundidos com estresses abióticos e deficiências nutricionais (Aboul-Ata *et al.*, 2011).

Portanto, métodos moleculares têm sido utilizados, proporcionando resultados satisfatórios e precisos permitindo o controle e minimizando perdas de produção. Essas diversas técnicas podem variar desde as mais tradicionais como microscopia eletrônica, inoculação em plantas hospedeiras e testes sorológicos; até as mais sofisticadas e robustas como micro arranjos e tecnologias de alto sequenciamento de ácidos nucleicos (HTS) (Jeong *et al.*, 2014).

O HTS tem se tornado cada vez mais viável por obter um sequenciamento (DNA ou RNA) eficiente, em um curto espaço de tempo e com baixo custo (Barba *et al.*, 2014). Quanto à

detecção em vírus de planta, essas técnicas permitem novas descobertas de espécies e até gêneros, contribuindo para estudos de epidemiologia, ecologia, diversidade, taxonomia e transcriptomas (Howell *et al.*, 2011).

O uso dessas técnicas revela que as doenças de etiologia viral podem ser causadas tanto por espécies novas quanto por aquelas que foram pouco caracterizadas. Os dados gerados após esse sequenciamento são interpretados com ajuda de bioinformática e as informações levantadas podem ser usadas em programas de certificação de plantas e quarentena, visando o controle de doenças virais a nível nacional e internacional (Marston *et al.*, 2013).

Em geral, os fitovírus são controlados de forma preventiva, dificultando ou impedindo que os vírus cheguem até uma determinada cultura, evitando assim, sua dispersão (Abdalla *et al.*, 2018). A utilização de inseticidas para controlar potyvirus, por exemplo, não é eficiente quando o tipo de transmissão é não-persistente, ou seja, após a aquisição do vírus pelo vetor, a transmissão ocorre em poucos minutos ou horas através da picada de prova (Perring *et al.*, 1999).

É importante conhecer antes as diferentes maneiras e relações existentes durante os processos de transmissão virais para poder escolher qual a medida de controle deverá ser aplicada. Algumas medidas de controle não são seletivas, ou seja, abrange uma ampla gama de vírus e seus vetores; outras são seletivas, visando um determinado vírus e seu vetor, não sendo aplicável para outros patossistemas (Zitter & Simons, 2003).

Ao combinar medidas de controle dentro de estratégias integradas voltadas para o gerenciamento de doenças, o sucesso é otimizado por meio da inclusão de medidas seletivas e outras que não são seletivas (Jones, 2006). Dessa forma, é necessário desenvolver estudos mais detalhados que auxiliam compreender as diversas formas de interação que existem entre vírus/vetor/hospedeira (Wang *et al.*, 2018).

Entender as relações agroecológicas existentes trarão condições de obter plantas livre de vírus seja por cultura de tecido ou métodos de controle via melhoramento genético com o intuito de obter plantas transgênicas com altos níveis de resistência a vírus de RNA e DNA (Wang *et al.*, 2018). A produção de plantas livre de vírus a partir de técnicas de cultura de tecido é essencial para controlar doenças virais, impor cultivares novas oriundas de outros países, trocar materiais de reprodução de outras regiões e preservar o banco de germoplasma vegetal (Panattoni *et al.*, 2013).

Métodos *in vitro* baseados em termoterapia com cultura de meristema, quimioterapia, micro enxerto e crioterapia foram estabelecidos com sucesso para a erradicação de vários vírus

em quase todas as culturas economicamente importantes (Wang *et al.*, 2018). Estudos de localização de proteínas a nível celular e de mecanismos de silenciamento gênico trazem informações relevantes de como esses vírus atuam no ambiente celular e quais as diferenças que eles possuem com relação a outras espécies virais que já são bem conhecidas (Daros, 2017).

Esses estudos abrem caminhos que ajudam a desenvolver plantas transgênicas resistentes a vírus de RNA e DNA (Galvez *et al.*, 2014; Kamthan *et al.*, 2015). O silenciamento gênico apresenta alta especificidade e diversas respostas no combate à invasão de moléculas exógenas. Os genes P1, HC-Pro, VPg (*Turnip mosaic virus*- TuMV) e P1N-PISPO (*Sweet potato feathery mottle virus*- SPFMV) foram relatados apresentando atividade de supressão do silenciamento gênico (Rodamilans *et al.*, 2018; Giner *et al.*, 2010; Cheng & Wang, 2017; Rajamaki *et al.*, 2014).

Porém, existe estratégias que contornam essas atividades virais produzindo plantas transgênicas livre de vírus, uma dessas estratégias é o uso de micro RNAs artificiais, ou simplesmente amiRNAs que são pequenos RNAs não codantes (Galvez *et al.*, 2014; Kamthan *et al.*, 2015). Os amiRNAs são projetados para atingir um ou vários genes de interesse, fornecendo uma abordagem nova e altamente específica para o eficaz silenciamento de genes pós-transcricional em plantas (PTGS) (Kotowska-Zimmer *et al.*, 2021).

A família *Potyviridae* é uma das maiores famílias de vírus de planta, extremamente importante do ponto de vista econômico, já que afeta uma ampla gama de hospedeiras causando doenças e trazendo perdas significativas, tudo isso torna essa família uma das mais estudadas devido a importância que ela possui (King *et al.*, 2012). Logo, uma completa caracterização biológica e molecular, ajuda no correto manejo da doença e a propor medidas de controle adequadas contra a ação desses vírus (Petersen *et al.*, 2019).

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, O. A.; ERAKY, A. I.; MOHAMED, S. A.; FAHMY, F. G. Management of *Potato virus Y* (PVY<sup>NTN</sup>) causing potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) in potato by prior treatment with a mild PVY strain (2018). *Journal of Plant Protection Research*, 58(2): 130-136p. DOI: <https://doi.org/10.24425/119130>

ABIEC- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne do Brasil. Brasil lidera ranking de exportação de carne bovina (2019). Disponível em: [http://www.abiec.com.br/news\\_view](http://www.abiec.com.br/news_view)

ABOUL-ATA, E.; MAZYAD, H.; EL-ATTAR, A. K.; SOLIMAN, A. M.; ANFOKA, G.; ZEIDAN, M.; OROVITS, R.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H. Diagnosis and control of cercal viruses in the middle east (2011). *Advances in Virus Research*, (81): 33-61p. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00007-9>

ADAMS, M. J.; ANTONIN, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae* (2005). *Molecular Plant Pathology*, 6(4): 471-487p. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00296.X>

ADAMS, M. J.; ZERBINI, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. Family *Potyviridae*. In: KING, M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. *Virus Taxonomy. Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Virus* (2012). Elsevier Academic Press, London, 1069-1089p.

ADAMS, M. J.; ZERBINI, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. *Virus Taxonomy. Ten Report of the International Committee on Taxonomy of Virus* (2017). New York: Academic Press, 1327p.

ALA-POIKELA, M.; GOYTIA, E.; HAIKONEN, T.; RAJAMAKI, M. L.; VALKONEN, J. T. Helper component proteinase of genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factor eIF(iso)4E and eIF4E that contains a 4E binding motif (2011). *Journal of Virology*, 85: 6784-6794p. DOI: <https://doi.org/JVI.00485-11>

ALMEIDA, O. J. I.; HERLING, V. R.; PEREIRA, L. E. T. Gramíneas forrageiras de clima temperado e tropical (2016). FZEA-USP, Pirassununga, 1-95p. Disponível em: [media.wix.com/ugd/58flla\\_c6b376dad4e94c50b3a54f18cde21a82.pdf](http://media.wix.com/ugd/58flla_c6b376dad4e94c50b3a54f18cde21a82.pdf)

ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L.; SALES, M. K. Estilosantes Campo Grande: leguminosa forrageira recomendada para solos arenosos do Acre (2010). EMBRAPA. Circular

Técnica 55, Rio Branco- AC, 1-12p. Disponível em:  
[http://iquiri.cpfac.embrapa.br/pdf/circtec\\_55\\_02022011\\_br.pdf](http://iquiri.cpfac.embrapa.br/pdf/circtec_55_02022011_br.pdf)

ANDRADE, C. M. S. Construindo um ideótipo de gramínea para consorciação com a leguminosa Estilosantes Campo Grande. In: SOUZA, F. H. D.; MATTA, F. P.; FÁVERO, A. P. Construção de ideótipos de gramíneas para usos diversos (2013). EMBRAPA. Brasília- DF, 283-292p.

ARAGÃO, A. & CONTINI, E. O agro no Brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020 (2020). Secretaria de Inteligência e Relações Estratégicas da Embrapa (SIRE-Embrapa). 37-39p. Disponível em:  
<https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MUNDO.pdf/41e20155-5cd9-f4ad-7119-945e147396cb>

ATEKA, E.; ALICAI, T.; NDUNGURU, J; TAIRO, F.; SSERUWAGI, P.; KIARIE, S.; MAKORI, T.; KEHOE, M. A.; BOYKIN, L. M.; Unusual occurrence of a DAG motif in the *Ipomovirus Cassava brown streak virus* and implications for its vector transmission (2017). PLoS ONE 12(11): e0187883, 1-22p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187883>

BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology (2014). Viruses, (6): 106-136p. DOI: <https://doi.org/10.3390/v6010106>

BARBOSA, F. A.; SOARES-FILHO, B. S.; MERRY, F. D.; AZEVEDO, H. O.; COSTA, W. L. S.; COE, M. T.; BATISTA, E. L. S.; MACIEL, T. G.; SHEEPERS, L. C.; OLIVEIRA, A. R.; RODRIGUES, H. O. Cenários para a pecuária de Corte amazônica (2015). Centro de Sensoriamento Remoto e Escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Aliança da Terra. Virginia Tech Woods Hole Research Center. Disponível em:  
<https://www.researchgate.net/publication/304011805>

BARCELOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; JUNIOR, G. B. M. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros (2008). Rer. Bras. De Zootecnia, 37: 51-67p. DOI: <http://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300008>

BIANCARD, E.; TAMADA, T. Rhizomania. Switzerland: Springer, 2016. 155p.

BRAIDWOOD, L.; MULLER, S. Y.; BAULCOMBE, D. Extensive recombination challenges the utility of *Sugarcane mosaic virus* phylogeny and strain typing (2019). Scientific Reports, 9:20067, 1-9p. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56227>

CARVALHO, P. C. F.; BARRO, R. S.; NETO, A. B.; NUNES, P. A. A.; MORAES, A.; ANGHINONI, I.; BREDEMEIER, C.; BAYER, C.; MARTINS, A. P.; KUNRATH, T. R.; SANTOS, D. T.; CARMONA, F. C.; BARROS, T.; FILHO, W. S.; ALMEIDA, G. M.; CAETANO, L. A. M.; CECAGNO, D.; ARNUTTI, F.; DERNADIN, L. G. O.; BONETTI, J. A.; TONI, C. A. G.; BORIN, J. B.M. Integrating the pastoral component in agricultural systems (2018). Rev. Bras. De Zootecnia, 47: 1-12p. DOI: <https://doi.org/10.1590/rbz4720170001>

CERVERA, M. T.; RIECHMANN, J. L.; MARTÍN, M. T.; GARCÍA, J. A. 3'-terminal sequence of the *Plum pox virus* PS and Ö6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group (1993). Journal of General Virology, (74): 329-334p. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-3-329>

CHEN, J.; SHI, N.; CHWNG, Y.; DIAO, A.; CHEN, J.; WILSON, T. M. A.; ANTONIW, J. F.; ADAMS, M. J. Molecular analysis of barley yellow mosaic virus isolates from China (1999). Virus Research, 64(1): 13-21p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00076-3)

CHENG, X. & WANG, A. The potyvirus silencing supressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autoghagy pathways (2017). Journal Virology, 90(1): e01478-16, 1-16p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01478-16>

CHUNG, B. Y.; MILLER, W. A; ATKINS, J. F; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae* (2008). Proc Natl Acad Sci, 105: 5897-5902p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0800468105>

COSTA, L. C.; SARTORI, A. L. B.; POTT, A. Estudo taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae- Papilionoideae- Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul (2016). 59(3): 547-572p. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859310>

CUI, H. & WANG, A. Plum Pox Virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection (2016). Journal Virology. May 15; 90(10): 5119–5131p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00024-16>

DALAKOURAS, A.; JARAUSCH, W.; BUCHHOLZ, G.; BASSELER, A.; BRAW, M.; MANTHEY, T.; KARZAR, G.; WASSENEGGER, M. Delivery of hairpin RNAs and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption (2018). Frontiers Plant Scienc, (9): 1-11p. DOI: <https://10.3389/fpls.2018.01253>

DAROS, J-A. Viral suppressors combatting: RNA silencing (2017). Nature Plants, (3): 17098, 1-2p. Fonte: [Viral Suppressors: Combatting RNA silencing \(nature.com\)](https://www.nature.com/articles/nature17098)

DEL-TORO, F.; FERNÁNDEZ, F. T.; TILSNER, J.; WRIGHT, K. M.; TENLLADO, F.; CHUNG, B. N.; PRAVEEN, S.; CANTO, T. Potato virus Y HC-Pro localization at distinct,

dynamically related and environment-influenced structures in the cell cytoplasm (2014). *Molecular Plant Microbe*, 27(12): 1331-1343p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1084/MPMI-05-14-0155-R>

DENG, P.; WU, Z.; WANG, A. The multifunctional protein CI of potyviruses plays interlinked and distinct roles in viral genome replication and intercellular movement (2015). *Virology Journal*, 12(141); 1-11p. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0369-2>

DESBIEZ, C.; JOANNON, B.; WIPF-SCHEIBEL, C. CHANDEYSSON, C.; LECOQ, R. (2011) Recombination in natural populations of watermelon mosaic virus: new agronomic threat or damp squib? (2011). *Journal General Virology*, (92):1939–1948p. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.031401-0>

DIAS-FILHO, M. B. Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação (2011). 4. ed. rev. Belém- PA, 13-38p.

DIAS-FILHO, M. B. Diagnóstico das pastagens no Brasil (2014). ISSN 1983-0513, Embrapa Amazônia Oriental, Belém- PA. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/102203/1/DOC-402.pdf>

DIEHL, M. S.; OLIVO, C. J.; AGNOLIN, C. A.; BRATZ, V. F.; BEM, C. M.; AGUIRRE, P. F.; GLIENKE, C. L.; CORREA, M. R.; SERAFIM, G. Produtividade de sistemas forrageiros consorciados com leguminosas (2013). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 65(5): 1527-1536p. DOI: <http://doi.org/10.590/S0102-09352013000500034>

DOMBROVSKY, A.; REINGOLD, V.; ANTIGUNUS, Y. *Ipomovirus*: an atypical genus in the Family *Potyviridae* transmitted by whiteflies (2014). *Pest Manag Sci*, 70: 1552-1567p. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3735>

ELENA, S. F. & RODRIGO, G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions (2012). *Current Opinion in Virology*, 2: 719-724p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conviro.2012.09.004>

FAJARDO, T. V. M. & NICKEL, O. Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas (2019). Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves- RS, 1-25p.

FANG, X. & QI, Y. RNAi in plants: an argonaute-centered view (2016). *The Plant Cell*, (28): 271-285p. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00920>

FAO. Pecuária sustentável em mudanças climáticas na América Latina (2021). Disponível em: <http://www.fao.org/americas/prioridades/ganaderia-sostenible/pt/>

FELLERS, J. P.; SEIFERS, D.; RYB-WHITE, M.; MARTIN, T. J. The complete genome sequence of *Triticum mosaic virus*, a new wheat-infecting virus of the High Plains (2009). Archives of Virology, 154:1511-1515p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0462-1>

FENG, X.; POPLAWSKY, A. R.; NIKOLAEVA, O. V.; MYERS, J. R.; KRASEV, A. V. Recombinants of bean common mosaic virus (BCMV) and genetic determinants of BCMV involved in overcoming resistance in common bean (2014). Phytopathology, (104):786–793p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-13-0243-R>

FERNANDES, C. D. Estilosantes Bela: Novo aliado da agropecuária brasileira (2019). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/193420/1/Estilosantes-Bela.pdf>

FERRAZ, J. B. S; FELÍCIO, P. E. D. Production systems - an example from Brazil (2010). Meat Science, 84(2): 238-243p. DOI: <https://doi.org/10.1015/j.meatsci.2009.06.006>

GALVEZ, L. L.; BANERJEE, J.; PINAR, H.; MITRA, A. Engineered plant virus resistance (2014). Plant Science, (228): 11-25p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.07.006>

GAO, L.; SHEN, W. T.; YAN, P.; TUO, D. C.; LI, X. Y.; ZHOU, P. A set of host proteins interacting with papaya ringspot virus NIa-Pro protein identified in a yeast two-hybrid system (2012). Acta Virológica, 56(1): 25-30p. DOI: <https://doi.org/10.419/av-2012-01-25>

GENG, C.; YAN, Z-Y.; CHENG, D-J.; LIU, J.; TIAN, Y-P.; ZHU, C-X.; WANG, H-Y.; LI, X-D. *Tobacco vein banding mosaic virus* 6K2 protein hijacks NbPsbO1 for virus replication (2016). Scientific Reports, 7:43455. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep43455>

GINER, A.; LAKATOS, L.; GARCÍA-CHAPA, M.; LÓPEZ-MOYA, J. J.; BURGYÁN, J. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs (2010). PLoS Pathogens, 6(7): e1000996, 1-13p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000996>

GOH, C. J.; HAHN, Y. Analysis of proteolytic processing sites in potyvirus polyproteins revealed differential amino acid preferences of NIa-Pro proteases in each of seven cleavage sites (2021). PLoS ONE, 16(1): e0245853, 1-14p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245853>

GONG, Y. N.; TANG, R. Q.; ZHANG, Y.; PENG, J.; XIAN, O. Y.; ZHANG, Z. H.; ZHANG, S. B.; ZHANG, D. Y.; LIU, H.; LUO, X. W.; LIU, Y. The NIa-Protease protein encoded by the *Pepper mottle virus* is a pathogenicity determinant and releases DNA

methylation of *Nicotiana benthamiana* (2020). *Frontiers in Microbiology*, 11(102): 1-19p. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00102>

HERLING, V. R. & PEREIRA, L. E. T. Leguminosas forrageiras de clima tropical e temperado (2016). Pirassununga, 1-103p. Disponível em: <https://sites.usp.br/gefepfzea/wp-content/uploads/sites/134/2014/05/Leguminosas.pdf>

HERRERA, M. del R.; VIDALON, L. J.; MONTENEGRO, J. D.; RICCIO, C.; GUZMAN, F.; BARTOLINI, I.; GHISLAIN, M. Molecular and genetic characterization of the Ryadg locus on chromosome XI from Andigena potatoes conferring extreme resistance to *Potato virus Y* (2018). *Theoretical and Applied Genetics*, 131(9): 1925–1938p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3123-5>

HOWELL, W. E.; THOMPSON, D.; SCOTT, S. Virus-like disorders of fruit trees with undetermined etiology (2011). Chapter 48 in: *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. DOI: <https://doi.org/10.1094/9780890545010.048>

INGWELL, L. L.; SANFORD, D. E.; BOSQUE-PÉREZ, N. A. Plant viroses alter insect behavior to enhance their spread (2012). *Scientific Reports*, 2(578): 1-17p. DOI: <https://doi.org/10.1038/spred00578>

IVANOV, K. I.; ESKELIN, K.; LÖHMUS, A.; MÄKINEN, K. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection (2014). *Journal of General Virology*, 95: 1415-1429p. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.064220-0>

IVANOV, K. I.; ESKELIN, K.; BASIC, M.; DE, S.; LOHMUS, A.; VARJOSALO, M.; MAKINEN, K. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HC-Pro (2016). *The Plant Journal*, 85: 30-45p. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.13088>

JEONG, J-J.; JU, H-J.; NOH, J. A review of a detection methods for the plant viruses (2014). *Research Plant Disease*, 2-(3): 173-181p. DOI: <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>

JONES, R. A. C. Control of plant virus diseases (2006). *Advances in virus research*, (6)67: 205-244p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)67006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)67006-1)

JOVER-GIL, S.; BEERI, A.; FRESMILLO, P.; SSMACH, A.; CANDELA, H. Complete genome sequence of a novel virus, classifiable within the *Potyviridae* family, wich infects passion fruit (*Passiflora edulis*) (2018). *Archives of Virology*, 163(11): 3191-3194p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3983-7>

KAMTHAN, A.; CHAUDHURI, A.; KAMTHAN, M.; DATTA, A. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement (2015). *Frontiers in Plant Science*, 6(208): 1-17p. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00208>

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. LEFKOWITZ, E. J. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (2012) Elsevier Academic Press.

KITAJIMA, E. W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018) (2020). *Biota Neotrópica*, 20(2): 1-101p. DOI: <http://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2019-0932>

KOCH, K. G.; JONES, T-K. L.; VARGAS-BADILLO, I. E. Arthropod vectors of plant viruses- mites transmission. In: AWASTHI, L. P. *Applied plant virology- advances, detection and antiviral strategies* (2010). Elsevier, Chapter 26: 349-369p.

KONDO, T. & FUJITA, T. Complete nucleotide sequence and construction of an infectious clone of Chinese yam necrotic mosaic virus suggest that *Macluravirus* have the smallest genome among members of the family *Potyviridae* (2012). *Archives of virology*, 157: 2299-2307p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1429-1>

KOTOWSKA-ZIMMER, A.; PEWINSKA, M.; OLEINICZAR, M. Artificial miRNAs as therapeutic tools: challenges and opportunities (2021). *Wires RNA*, (12): e1640, 1-33p. DOI: <https://doi.org/10.1002/wrna.1640>

LANGE, M.; YELLINA, A. L. ORASHAKOVA, S.; BECKER, A. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems (2013). *Methods in Molecular Biology*, 975: 1-14p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-278-0-1>

LAN, P.; MENG, Y.; SHEN, P.; LI, R.; MA, Y.; TAN, S.; CHEN, H.; CAO, M.; LI, F. Complete genome sequence of yam chlorotic necrosis virus, a novel *Macluravirus* infecting yam (2018). *Archives of virology*, 163: 2275-2278p. DOI: <https://doi.org/10.1007/S00705-018-3851-5>

LEFEUVRE, P.; LETT, J-M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. Widely Conserved Recombination Patterns among Single-Stranded DNA Viruses (2009). *Journal of Virology*, 83(6): 2697–2707p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02152-08>

LEWIS, G. L.; MACKINDER, B.; LOCK, M. *Legumes of the World* (2005). Trustees of the Royal Botanic Garden, *Edinburgh Journal of Botany*. 62(3): 195-199p. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960428606190198>

LOPES, J.; EVANGELISTA, A. R.; FORTES, C. A.; PINTO, J. C.; FREIRE, A. P. de B.; de SOUZA, R. M. Valor nutritivo de estilosantes Mineirão em função da correção do solo (2012). Pesquisa Agropecuária Tropical Goiânia, 42(1): 99-105p. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pat/a/vcxMqsgNCnztThbjTfQGNHz/?format=pdf&lang=pt>

LUAN, H.; SHINE, M. B.; CUI, X.; CHEN, X.; MA, N.; KACHROO, P.; ZHI, H.; KACHROO, A. The potyviral P3 protein targets eukaryotic elongation factor 1A to promote the unfolded protein responses and viral pathogenesis (2016). Plant Physiology, 172: 221-224p. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.16.00505>

MAGLIOGKA, V. I.; SALVADOR, B.; CARBONELL, A.; SAENZ, P.; LÉON, D. S.; OLIVEROS, J. C. Virus variants with differences in the P1 protein coexist in a *Plum pox virus* population and display particular host-dependent pathogenicity features (2012). Molecular Plant Pathology, 13(8): 877-886p. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00796.x>

MAPBiomás. Pastagens brasileiras ocupam área equivalente a todo o estado do Amazonas (2020). Disponível em: <https://mapbiomas.org/pastagens-brasileiras-ocupam-area-equivalente-a-todo-o-estado-do-amazonas>

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R. Doenças em plantas forrageiras (2011). Embrapa Gado de Corte, Campo Grande- MS, ISSN 1983-1974p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/916862/1/DoencasemplantasforrageirasDOC187.pdf>

MARSTON, D. A.; MCELHINNEY, L. M.; ELLIS, R. J.; HORTON, D. L.; WISE, E. L.; LEECH, S. L.; DAVID, D.; LAMBALLERIE, X.; FOOKS, A. R. Next generation sequencing of viral RNA Genomes (2013). BMC Genomics, 14(444): 1-12p. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-444>

MARTÍNEZ, F. & DARÒS, J. A. *Tobacco etch vein virus* protein P1 traffics to the nucleolus and associates with the host 60S ribosomal subunits during infection (2014). Journal of Virology, 88(18): 10725-10737p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00928-14>

MATILDA, E. T.; CHIARI, L.; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, C. D.; ARGUELHO, E. G.; BOTH, D. P. Variabilidade genética de acessos da cultivar “BRS Bela” de *Stylosanthes guianensis* usando marcadores moleculares RAPD (2013). Ciência Rural, Santa Maria-RS, 43(1): 114-119p. Disponível em: [Lucimara-a1213cr4679.pdf \(embrapa.br\)](https://www.scielo.br/cr/pdf/cr43n01a01.pdf)

MBANZIBWA, D. R.; TIANY, P.; TUGUME, A. K.; PATIL, B. L.; YADAN, J. S.; BAGEWADI, B.; ABARSHI, M. M.; ALICAI, T.; CHANGADEYA, W.; MKYMBIRA, J.;

MULI, M. B.; MUKASA, S. B.; TAIRO, F.; BAGUMA, Y.; KYAMANYWA, S.; KULLAYA, A.; MARUTHI, M. N.; FAUQUET, C. M.; VALKONEN, J. P. T. Evolution of cassava brown streak disease-associated viruses (2011). *Journal of General Virology*. 92: 974-987p. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.026922-0>

MERITS, A.; RAJAMAKI, M. L.; LINDHOLM, P.; RONEBERG-ROOS, P.; KEKARAINEN, T.; PUUSTINEN, P.; MAKELAINEN, K.; VALKONEN, J. P. T.; SAARMA, M. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insects and plant cells (2002). *J. Gen. Virol.* 83(5): 1211-1221p. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-5-1211>

MINGOT, A.; VALLI, A.; RODAMILANS, B.; LÉON, D. S.; BAULCOMBE, D. C.; GARCIA, J. A.; LÓPEZ-MOYA, J. J. The P1N-PISPO *trans-frame* gene of sweet potato feathery mottle potyvirus is produced during virus infection and functions as an RNA silencing suppressor (2016). *Journal of Virology*, 90(7): 3543-3557p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.02360-15>

MINUTILLO, S. A.; MARAIS, A.; MASCIA, T.; FAUREC, C.; SVANELLA-DUMAS, L.; THEIL, S.; PAYET, A.; PERENNEC, C.; SCHOEN, L.; GALLITELI, D.; CANDRESSE, T. Complete nucleotide of artichoke latent virus shows it to be a member of the genus *Macluravirus* in the family *Potyviridae* (2015). *Phytopathol*, 105(8): 1155-1160p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-15-0010-R>

MISHRA, R.; VERMA, R. K.; SHARMA, P.; CHOUDHARY, D. K.; GAUR, R. K. Interaction between viral proteins with the transmission of *Potyvirus* (2013). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(2): 240-253p. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.807659>

MOLLOV, D.; LOCKHART, B.; ZLESK, D. Complete nucleotide sequence of rose yellow mosaic virus, a novel member of the family *Potyviridae* (2013). *Archives of Virology*, 158: 1917-1923p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1686-7>

MORALES, F.J.; OSPINA, M. D.; CASTANO, M.; CALVERT, L. A. Sequence analysis of the genomic RNA 3'-terminal region of a *Potyvirus* from *Brachiaria* spp. Related to gulneagrass mosaic virus (1996). *Journal of Phytopathology*, 144(9-10): 485-489p. DOI: <http://10.1111/j.1439-0434.1996.tb00329.x>

NIGAM, D.; TOURRETTE, K. L.; SOUZA, P. F. N.; GARCIA-RUIZ, H. Genome-wide variation in potyviruses (2019). *Front. Plant. Sci.*, 10(1439): 1-28p. DOI: <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.01439>

PANATTONI, A.; LUVISI, A.; TRIOLO, E. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress (2013). Spanish journal of Agriculture Research, 11(1): 173-188p. DOI: <http://doi.org/10.5424/sjar/20131111-3201>

PASIN, F.; SIMON-MATEO.; GARCIA, J. A. The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses (2014). PLoS Pathogens, 10: e1003985, 1-16p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003985>

PEREIRA-CARVALHO, R. de C.; MEDEIROS, R. B. de; COSTA, C. L. Transmissão de vírus. In: MEDEIROS, R. B. de; RESENDE, R. de O.; PEREIRA-CARVALHO, R. de C.; DIANESE, E. de C.; COSTA, C. L.; SGRO, J-Y. (Eds.). Virologia Vegetal: conceitos, fundamentos, classificação e controle (2015). Brasília, DF: Editora UnB, 333-412p.

PERRING, T. M.; GRUENHAGEN, N. M.; FARRAR, C. A. Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors (1999). Annual Review Entomology, 44: 457-481p. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.457>

PETERSEN, S. M.; KEITH, C.; AUSTIN, K.; HOWARD, S.; SU, L.; QIU, W. A natural reservoir and transmission vector of grapevine vein clearing virus (2019). Plant Disease, 103: 571-577p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1073-RE>

PLISSON, C.; DRUCKER, M.; BLANC, S.; GERMAN-RETANA, S.; LE-GALL, O.; THOMAS, D.; BRON, P. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein (2003). Journal Biology Chemistry, 278(26): 23753-23761p. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M302512200>

RAJAMAKI, M. L., STRENG, J., & VALKONEN, J. P. T. Silencing suppressor protein VPg of a Potyvirus interacts with the plant silencing-related protein SGS3 (2014). Molecular Plant-Microbe Interactions, 27(11): 1199-1210p. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-14-0109-R>

REVERS, F. & GARCIA, J. A. Molecular biology of potyviruses (2015). Advances in virus research, 92(3): 101-199p. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>

REVERS, F.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; LE ROMANCER, M.; DUNEZ, J. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates (1996). Journal General Virology, 77: 1953–1965p. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-8-1953>

ROBAGLIA, C.; DURAND-TARDIF, M.; TRONCHET, M.; BOUDAZIN, G.; ASTIER-MANIFACIER, S.; CASSE-DELBART, F. Nucleotide sequence of *Potato virus Y* (N strain) genomic RNA (1989). Journal General of Virology, 70: 935-947p. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-4-935>

RODAMILANS, B.; VALLI, A.; GARCIA, J. A. Mechanistic divergence between P1 proteases of the family *Potyviridae* (2013). *Journal General Virology*, 94: 1407-1414p. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.050781-0>

RODAMILANS, B.; VALLI, A.; MINGOT, A.; LÉON, D. S.; BAULCOMBE, D.; LÓPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the *Potyviridae* family (2015). *Journal of Virology*, 89(13): 6965-6967p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00337-15>

RODAMILANS, B., VALLI, A., MINGOT, A., LEON, S. D., LOPEZ-MOYA, J. J., & GARCIA, J. A. An atypical RNA silencing suppression strategy provides a snapshot of the evolution of sweet potato-infecting Potyviruses (2018). *Scientific Reports*, 8(15937): 1-10p. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34358-y>

ROHOZKOVÁ, J., NAVRÁTIL, M. P1 peptidase – a mysterious protein of family *Potyviridae* (2011). *Journal of Biosciences* 36: 189-200p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9020-6>

ROSE, H.; DORIN, I.; VETTEN, H. J.; MONZEL, W.; RICHERT-POGGELER, K. R.; MAISS, E. Complete genome sequence and construction of a infectious full-length cDNA clone of celery latent virus- an unusual member of a putative new genus within the *Potyviridae* (2019). *Journal of General Virology*, 100, 308-320p. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001207>

SAHANA, n.; KAUR, H.; JAIN, R. K.; PALUKAITIS, P.; CANTO, T.; PRAYEEEN, S. The asparagine residue in the FRNK box potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization (2014). *Journal of General Virology*, 95: 1167-1177p. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.060269-0>

SCHUBERT, J.; FAUQUET, C.; MERITS, A.; RABENSTEIN, F. The complete nucleotide sequence of the Ryegrass mosaic potyvirus indicates that it is a recombinant between members of two different genera in the family *Potyviridae* (1999). *Journal of Plant Disease and Protection*, 106(4): 392-404p. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-8-2035>

SEO, J. K.; PHAN, M. S. V.; KANG, S-H.; CHOI, H-S.; KIM, K-H. The charged residues in the surface-exposed C-terminus of the *Soybean mosaic virus* coat protein are critical for cell-to-cell movement (2013). *Journal of Virology*, 446: 95-101p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.033>

SEO, J. K.; KWAK, H. R.; KIM, M. K.; KIM, J. S.; CHOI, H. S. The complete genome sequence of a novel virus, bellflower veinal mottle virus, suggests the existence of a new genus

within the family *Potyviridae* (2017). Archives of Virology. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3374-5>

SHAN, H.; PASIN, F.; TZANETAKIS, I. E.; SIMÓN-MATEO, C.; GARCIA, J. A.; RODAMILANS, B. Truncation of a P1 leader proteinase facilitates potyvirus replication in a non-permissive host (2018). Molecular Plant Pathology, 19(6): 1504-1510p. DOI: <https://10.1111/mpp.12640>

SHEN, W.; SHI, Y.; DAI, Z.; WANG, A. The RNA-dependent RNA polymerase N1b potyviruses plays multifunctional contrasting roles during viral infection (2020). Viruses 12(11): 77p. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12010077>

SHIBOLETH, Y. M.; HARONSKY, E.; LEIBMAN, O.; ARAZI, T.; WASSENEGGER, M.; WHITHAM, S. A.; GABA, V. GAL-ON, A. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development (2007). Journal of Virology, 81(23): 13135-13148p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01031-07>

SHONIESKI, F. R.; VIÉGAS, J.; BERMUDEZ, R. F. *et al.* Composição botânica e estrutural e valor nutritivo de pastagens de azevém consorciadas (2011). Rev. Bras. Zootec., 40: 550-556p. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300012>

SICARD, A. M. Y.; GUTIERREZ, S.; BLANC, S. The strange lifestyle of multipartite viroses (2016). PLoS Pathology, 12(11). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005819>

SILVA, K. N.; NICOLINI, C.; SILVA, M. S.; FERNANDES, C. D.; NAGATA, T.; RESENDE, R. O. First report of johnsongrass mosaic virus (JGMV) infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil (2013). Plant Disease, 97: 1003p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0013-PDN>

SIMIONI, T. A.; GOMES, F. J.; TEIXEIRA, U. H. G.; FERNANDES, G. A.; BOTINI, L. A.; MOUSQUER, C. J.; De CASTRO, W. J. R.; HOFFMANN, A. Potencialidade da consorciação de gramíneas e leguminosas forrageiras em pastagens tropicais (2014). PUBVET, Londrina, 8(13) ed. 262, art. 1742. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/uploads/ca80d9e4effe696b553fe49dbf5be840.pdf>

SOREL, M.; GARCIA, J. A.; GERMAN-RETANA, S. The *Potyviridae* cylindrical inclusion helicase: a key multipartner and multifunctional protein (2014). Molecular Plant-Microbe Interactions, 27(3): 215-226p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-11-3-0333-CR>

STAFFORD, C. A.; WALKER, G. P.; ULLMAN, D. E. Hitching a ride-vector feeding and virus transmission (2012). *Communicative & Integrative Biology*, 5(1): 43-49p. DOI: <https://doi.org/10.4161/cib.5.1.18640>

STENGER, D. C.; HALL, J. S.; CHOI, I-R.; FRENCH, R. Phylogenetic relationship within the Family *Potyviridae*: *Wheat streak mosaic virus* and *Brome streak mosaic virus* are not members of the genus *Rymovirus* (1998). *Phytopathology*, 88(8): 782-787p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.8.782>

SUN, P.; AUSTIN, B. P.; TOZSÉR, J.; WAUGH, D. S. Structural determinants of tobacco vein mottling virus protease substrate specificity (2010). *Protein Science*, 19: 2240-2251p. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.506>

SUSAIMUTHU, J.; TZANETAKIS, I. E.; GERGERICH, R. C.; MARTIN, R. R. A member of a new genus in the *Potyviridae* infects *Rubus* (2008). *Virus Research*, 131: 143-151p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.09.001>

TATINENI, S.; McMECHAN, A. J.; HEIN, G. L. *Wheat streak mosaic virus* coat protein is a determinant for vector transmission by the wheat curl mite (2018). *Virology*, 514:42-49p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.10.018>

TYAGI, S.; SULTANA, R.; JU, H-J.; LEE, W-H.; KIM, K.; LEE, K-J. The development of simple methods for the maintenance and quantification of *Polymyxa graminis* (2016). *Indian J. Microbiol*, 56(4): 482-490p. DOI: <http://doi.org/10.1007/s12088-016-0608-2>

UNTIVEROS, M.; OLSPERT, A.; ARTOLA, K.; FIRTH, A. E.; KREUZE, J. F.; VALKONEN, J. P. T. A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing (2016). *Molecular Plant Pathology*, 17(7): 1111-1123p. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12366>

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. *Potyvirus* protein: a wealth function (2001). *Virus Research*, 74: 157-175 p. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1701\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1701(01)00220-9)

VALLI, A. A.; GALLO, A.; RODAMILANS, B.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. The HC-Pro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking helper component that every virus would like to have (2018). *Molecular Plant Pathology*, 19(3): 744-763p. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12553>

WANG, M. B.; MASUTA, C.; SMITH, N. A.; SHIMURA, H. RNA silencing and plant viral diseases (2012). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10): 1275-1285p. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0093-CR>

WANG, M-R.; CUI, Z-H.; LI, J-W.; HAO, X-Y.; ZHAO, L.; WANG, Q-C. *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication (2018). *Plant Methods*, 14(87): 1-4p. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>

WEBSTER, C. G.; ADKINS, S. Low genetic diversity of *Squash vein yellowing virus* in wild and cultivated cucurbits in the U.S. suggests a recent introduction (2012). *Virus Research*, 163(2): 520-527p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.017>

WEI, T.; ZHANG, C.; HONG, J.; XIONG, R.; KASSCHAU, K. D.; ZHOU, X.; CARRINGTON, J. C.; WANG, A. Formation by the viral protein complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO (2010). *PLoS Pathogens*, 6(6): e1000962, 1-12p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000962>

WEN, R. H. & HAJUMORAD, M. P. Mutational analysis of the putative PIPO of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement (2010). *Virology*, 400: 1-7p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.022>

WEN, R. H.; SAGHAI, M. A.; HAJIMORAD, M. R. Amino acids changes in P3, and not be the overlapping pipo-encoded protein, determine virulence of *Soybean mosaic virus* on functionally imune Rsv1-genotype (2011). *Molecular Plant Pathology*, 12(8): 799-807p. DOI: <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00714.X>

WYLIE, S. J.; TAN, A. J.; LI, H.; DIXON, K. W.; JONES, M. G. K. *Caladenia virus A*, an unusual new member of the family *Potyviridae* from terrestrial orchids in Western Australia (2012). *Archives of Virology*, 1-7p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1452-2>

WYLIE, S. J., ADAMS, M., CHALAM, C., KREUZE, J., LOPEZ-MOYA, J. J., OHSHIMA, K., PRAVEEN, S., RABENSTEIN, F., STENGER, D., WANG, A.; ZERBINI, F. M. ICTV virus taxonomy profile: *Potyviridae* (2017). *Journal General Virology*, 98: 352–354p. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740>

YANG, K.; RAN, M.; LI, Z.; HU, M.; ZHENG, L.; LIU, W.; JIN, P.; MIAO, W.; ZHON, P.; SHEN, W.; CUI, H. Analysis of the complete genome sequence of a novel virus, areca palm necrotic spindle-spot virus, reveals the existence of a new genus in the Family *Potyviridae* (2018). *Archives of Virology*, 163: 3471-3475p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3980-x>

YOU, Y & SHIRAK, Y. *Bymovirus* reverse genetics: requirements for RNA-2 encoded proteins in systemic infection (2010). *Molecular Plant Pathology*, 11(3): 383-394p. DOI: <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2010.00613.X>

ZHANG, P.; PENG, J.; GUO H.; CHEN, J.; CHEN, S.; WANG J.; Complete genome sequence of yam chlorotic necrotic mosaic virus from *Dioscorea parviflora* (2016). Archives of Virology, 161:1715-1717p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2818-7>

ZHENG, Y-X.; CHEN, C-C.; CHEN, Y-K.; JAN, F-J. Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis orchids* (2008). Eur J Plant Pathol 121:87–95p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9281-6>

ZILIAN, E. & MAISS, E. Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions in plant using an optimized MRFP-based bimolecular fluorescence complementation system (2011). Journal of General Virology, 92(Pt 12): 2711-2723p. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.033811-0>

ZITTER, T. A. & SIMONS, J. N. Management of viruses by alteration of vector efficiency and by cultural practices (2003). Annual Review of Phytopathology, 18(1): 289-310p. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.001445>

## CHAPTER 2:

### TWO VIRUSES FROM *STYLOSANTHES GUIANENSIS* MAY REPRESENT A NEW GENUS WITHIN *POTYVIRIDAE*

Jamile Mendes de Souza<sup>a</sup>, Karina Nascimento da Silva Fragoso<sup>a</sup>, Anelise Franco Orílio<sup>a</sup>, Fernando Lucas Melo<sup>a</sup>, Tatsuya Nagata<sup>a</sup>, Celso Dornelas Fernandes<sup>b</sup>, José Raul Valério<sup>b</sup>, Fabrícia Zimmermann Vilela Torres<sup>b</sup>, Bruno Barbosa Amaral<sup>b</sup>, Thays Benites Camargo Pereira<sup>b</sup>, Athos Silva de Oliveira<sup>a</sup> and Renato Oliveira Resende<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, University of Brasilia, CEP 70910-900, Brasilia, DF, Brazil

<sup>b</sup> Embrapa Beef Cattle, CEP 79106550, Campo Grande, MS, Brazil

This work was published in a modified version in the journal *Virus Research*.

**Impact factor : 3.303**

de Souza, J. M.; Fragoso, K. N. da S.; Orílio, A. F.; Melo, F. L.; Nagata, T.; Fernandes, C. D.; Valério, J. R.; Torres, F. Z. T.; Amaral, B. B.; Camargo Pereira, T. B.; de Oliveira, A. S.; Resende, R. O. Two viruses from *Stylosanthes guianensis* may represent a new genus within *Potyviridae* (2021). VIRUS RESEARCH, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198257>

## ABSTRACT

Forage crops occupy large areas of tropical pastures for cattle feeding in Brazil. The use of stylos (*Stylosanthes* spp.) in these pastures, which are leguminous shrubs, has increased in the country due to their outstanding nutritional value and for being an efficient and alternative source for nitrogen fixation in the soil. In recent years, virus-like mosaic symptoms on *S. guianensis* leaves have often been observed in the field, indicating possible virus-like pathogen infections. In an effort to identify the causal agent, virus semi-purification protocol was performed using symptomatic *S. guianensis* leaves collected at EMBRAPA Beef Cattle Research Center. Total RNA extracted from this semi-purified preparation was submitted to high-throughput sequencing, which revealed complete genome sequences of novel viruses of the family *Potyviridae*. These viruses, tentatively named stylo mosaic-associated virus 1 (StyMaV-1) and stylo mosaic-associated virus 2 (StyMaV-2), shared 73 % CP aa identity and 77 % polyprotein aa identity with each other and, after that, being closest related to blackberry virus Y, genus *Brambyvirus* (only 41 % CP aa identity). Based on ICTV genus demarcation criteria, StyMaV-1 and StyMaV-2 represent new species of a new genus within the family *Potyviridae*. StyMaV-1 and StyMaV-2 are also not efficiently transmitted to other plant species by mechanical inoculation.

**Keywords:** *Stylosanthes*, Stylo mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, Stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, 'Stylomovirus'

The genus *Stylosanthes* Sw. (Family Fabaceae or Leguminosae) encompasses leguminous plant species widely spread in the tropical and subtropical regions out of South America (Dutra *et al.*, 2014). This genus has seven species with large distribution in the Brazilian territory: *S. capitata*, *S. angustifolia*, *S. gracilis*, *S. viscosa*, *S. humilis*, *S. scabra* and *S. guianensis* (Medeiros and Flores, 2014). These species, also known as stylos, have become increasingly important over the last decades as forage crops (Jank *et al.*, 2011).

Tolerant to acidic and low fertile soils, stylos present high nutritional value and the highest number of cultivars developed among the tropical legumes used as pasture. As nitrogen-fixing symbiotic plants, stylos have great potential in recovering poorly nutritional and degraded areas (Andrade *et al.*, 2010). Thus, stylos are often cultivated in consortia with forage grasses like *Urochloa decumbens*, *Brachiaria brizantha*, and *Andropogon gayanus* to feed cattle in Brazil (Schultze-Kraft *et al.*, 2018).

Overall, pastures have been submitted to intense degradation due to poor management practices, especially in regard to pests and diseases (Merten and Minella, 2013). Considering only viruses, symptoms such as mosaic, yellowing, and dwarfing have been reported on forage plants. Since these symptoms can compromise plant development, they can also impact on the nutritional value of a given forage crop (Silva *et al.*, 2013).

Viruses classified in the family *Potyviridae* account for about 30% of the currently known plant viruses, some of which are responsible for significant losses on the production and quality of agricultural, pastoral, horticultural and ornamental crops (Bernardo *et al.*, 2018). This family has 12 genera that group viruses based on their genome organization, mode of transmission, and phylogeny (Rose *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2018).

At this moment, the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) recognizes around 228 species, which are either classified in those genera or are unassigned. So far, viruses in the family *Potyviridae* can be transmitted by aphids (genera *Potyvirus* and *Macluravirus*), eriophyid mites (genera *Rymovirus*, *Poaceavirus* and *Tritimovirus*), plasmodiophorid fungi (genus *Bymovirus*), and whiteflies (genus *Ipomovirus*) (Yang *et al.*, 2018).

High-throughput sequencing (HTS) technologies are rapidly becoming popular to study viromes and obtain virus genome sequences in an unbiased and relatively fast manner (Barba *et al.*, 2014; Capobianchi *et al.*, 2013). In the plant virus scenario, HTS has allowed the identification and study of several virus/host pathosystems in a variety of economic important crops by our group, like the first report of johnsongrass mosaic virus (JGMV; genus *Potyvirus*) infecting forage grasses in Brazil (Silva *et al.*, 2013); viromes in garlic cultivars (da Silva *et al.*,

2019), the first closterovirus identified in arracacha plants (Orlío *et al.*, 2018), and the identification of orthospoviruses infecting vegetables crops in the Dominican Republic (Martínez *et al.*, 2018).

Using a similar approach of the reports abovementioned, leaves of two *S. guianensis* cv. Mineirão shrubs showing mosaic and chlorotic spots (Fig. 1) were collected in March of 2013 in the experimental field of EMBRAPA Beef Cattle Station in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Virus semi-purification was performed by differential centrifugation. Briefly, ten grams of stylo leaves were grounded with liquid nitrogen and homogenized in 100 mL of 0,1M phosphate buffer (pH 8.0) with 1 mM EDTA and 0.2 %  $\beta$ -mercaptoethanol, followed by filtration with tissue cloth.

The filtrate was centrifuged for 20 min at 3,836 x g for removal of cellular debris. The supernatant was then ultra-centrifuged at 33,000 x g for 2 hours through a 20% sucrose cushion. Pellets were processed for RNA extraction with RNeasy plant mini kit (Qiagen, Hilde, Germany) following the manufacturer's instruction. The RNA samples were pooled and sequenced by Illumina HiSeq 2000 platform at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea), generating about 40 million reads. The paired-end reads were trimmed and assembled using CLC Genomics Workbench 7.0 software.

The resulting contigs were analyzed using BLASTx (Altschul *et al.*, 1990) implemented on Geneious 11.0.5 program against the viral RefSeq database (GenBank). The reference genome of BVY (NC\_008558) was used for filtering the new virus contigs. At the end, three putative new virus genomes genetically related to members of the family *Potyviridae* were identified and annotated using Geneious 11.0.5 program.

To exclude any possibility of generating artificial chimeric viruses, the trimmed paired-reads from each assembled virus genome were mapped against each other and no reads cross-mapped using the following parameters: mismatch cost =3, insertion cost =3, deletion cost =3, length fraction =0.5, and similarity fraction =0.9. Map to reference was also used to estimate sequencing coverage.



**Figure 1:** Leaves of *S. guianensis* cv. Mineirão showing virus-like mosaic and chlorotic spots symptoms.

Two of these new putative viruses are referred to and have been tentatively named as stylo mosaic-associated virus 1 (StyMaV-1) and stylo mosaic-associated virus 2 (StyMaV-2). A third potyvirus from genus *Roymovirus* was also identified in the samples, but its characterization is currently under investigation. Interestingly, StyMaV-1 and StyMaV-2 have been always detected by RT-PCR co-infecting symptomatic *S. guianensis* cv. Mineirão collected in 2014 (3 out of 5 samples) and 2018 (8 out of 10 samples), and in symptomatic *S. guianensis* cv. Bela collected in 2019 (2 out of 2 samples).

All these leaf samples were collected in the experimental field of EMBRAPA Beef Cattle. These RT-PCR, which amplify CP genes, were performed with primers FWMAV-1 (5'-GGA TCC GAA TCA CCA TTA CAG GGA GG-3') and RVMAV-1 (5'-CTC GAG TTA TAT TGC TAT ATT AGT TCC C-3') for StyMaV-1, and FWMAV-2 (5'-GGA TCC TCA GGA TCA ATT GAG GGT GG-3') and RVMAV-2 (5'-CTC GAG TCA TAT GGT TAT ACT AGT TC-3') for StyMaV-2.

To determine the 5' end of the viral RNA genomes, the 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends kit (Thermo Fisher Scientific) was used. Specific reverse primers (5'-ACT CCC TAG TTT TAC GCT CTT TTC-3' and 5'-ATC ATC AAC CTT AAT GAG TGC ATC CAT AC-3') were used for cDNA synthesis of StyMaV-1 and StyMaV-2, respectively. Homopolymeric tails were added to the cDNA strands using terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and dCTP.

First PCRs were performed with 5' RACE Abridged Anchor Primer (supplied in the kit) and the reverse primers 5'-ATT CTT AAA TGG ACA ATG TGG GCA C-3' for StyMaV-1 and 5'-TGC TTA ATC TTT GCT TTC TGC TCA TGG-3' for StyMaV-2. Second PCRs were performed with Abridged Universal Amplification Primer (AUAP; supplied in the kit) and the internal specific reverse primers 5'-TGC CAT TTG TGT AAT TGT CTC CTT AC-3' for StyMaV-1 and 5'-TGT TGC CAT CTC AGT GCT CTT TG-3' for StyMaV-2.

Platinum Taq DNA Polymerase was used in all PCRs following the manufacturer's protocol. All PCR products were cloned into pGEM-T Easy following the manufacturer's protocol and sequenced at Macrogen Inc. At the end, the 5' untranslated regions (UTR) of StyMaV-1 and StyMaV-2 were 198 nt and 188 nt, respectively.

The 3' end was determined by cDNA synthesis using SuperScript III Reverse-Transcriptase with anchor primer dT50M10: 5'-AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA T<sub>50</sub>-3' (Lamounier *et al.*, 2015). Forward virus specific primers 5'-GGA TCC GAA TCA CCA TTA CAG GGA GG-3' and 5'-GGA TCC TCA GGA TCA ATT GAG GGT GG-3' were designed

to anneal on the *coat protein (CP)* genes of StyMaV-1 and StyMaV-2, respectively. These primers were combined with reverse anchor primer M10 (5'-AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA-3') for 3' end amplification by PCR.

All PCR products were cloned into pGEM-T Easy following the manufacturer's protocol and sequenced at Macrogen Inc. After sequencing, the 3' UTR of StyMaV-1 and StyMaV-2 were 150 nt and 151 nt, respectively, excluding the poly(A) tails. It is important to mention that amplification of CP genes and 3' and 5'UTRs successfully confirmed the assembled genomes. As seen in Fig. 2a, StyMaV-1 full genome was 9,231 nt long (assembled from 6,707 reads, mean coverage of 72x) with two open reading frames (ORF).

The StyMaV-1 ORF 1 spans over 8,883 nt and encodes a large polyprotein of 2,961 aa. The StyMaV-2 full genome was 9,216 nt long (assembled from 8,479 reads, mean coverage of 112x). The StyMaV-2 ORF 1 spans over 8,877 nt and encodes a polyprotein of 2,959 aa. Both StyMaV-1 and StyMaV-2 have an ORF 2, with 306 nt and 312 nt, respectively, that overlaps the P3-encoding region of the ORF 1 and encodes PIPO (Pretty Interesting *Potyviriidae* ORF).

PIPO is conserved in the genomes of all potyvirids and was shown to depend on programmed transcriptional slippage at a conserved GA<sub>6-7</sub> sequence to be produced (Olsper *et al.*, 2015; Rodamilans *et al.*, 2015). In StyMaV-1 and StyMaV-2, the GA<sub>6-7</sub> sequence is altered to CA<sub>7</sub> and UA<sub>7</sub>, respectively. Actually, some mutational screening suggested that 5' "G" is not essential for transcriptional slippage (Cheng *et al.*, 2017).

To confirm if these alternative motifs are likely functional, the trimmed reads were mapped to StyMaV-1 and StyMaV-2 genomes and slippage events at each putative slip site sequences were detected at 3.38% (7/207 reads) and 4.7% (5/106 reads). Altogether, these data suggest that P3N-PIPO in StyMaV-1 and StyMaV-2 is probably generated by transcriptional slippage. Annotated genomes were deposited on GenBank under accession numbers MK965971 and MK965972.

The cleavage sites of StyMaV-1 and StyMaV-2 polyproteins were predicted and annotated in comparison with the type-species of each genus in the family *Potyviriidae* (Table S 2.1). After proteolytic cleavage at specific sites, ten proteins were predicted: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb and CP (Fig. 2a). Thus, nine cleavage sites were also predicted based on functional assays from other potyvirids (Adams *et al.*, 2005a; Rohožková and Navrátil, 2011; Verchot *et al.*, 1992).

The P1-Pro and HC-Pro proteins act in *cis* cleaving themselves from the polyprotein at the P1-Pro/HC-Pro and HC-Pro/P3 junctions, respectively. The NIa-Pro protein acts in *cis*,

cleaving itself (NIa/NIb), and in *trans*, cleaving other viral proteins out of the polyprotein (Martínez *et al.*, 2016). The P1-Pro and HC-Pro proteins of StyMaV-1 and StyMaV-2 have conserved cleavage sites with other potyvirids, Y/S and G/G, respectively (Adams *et al.*, 2005a; Maia *et al.*, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

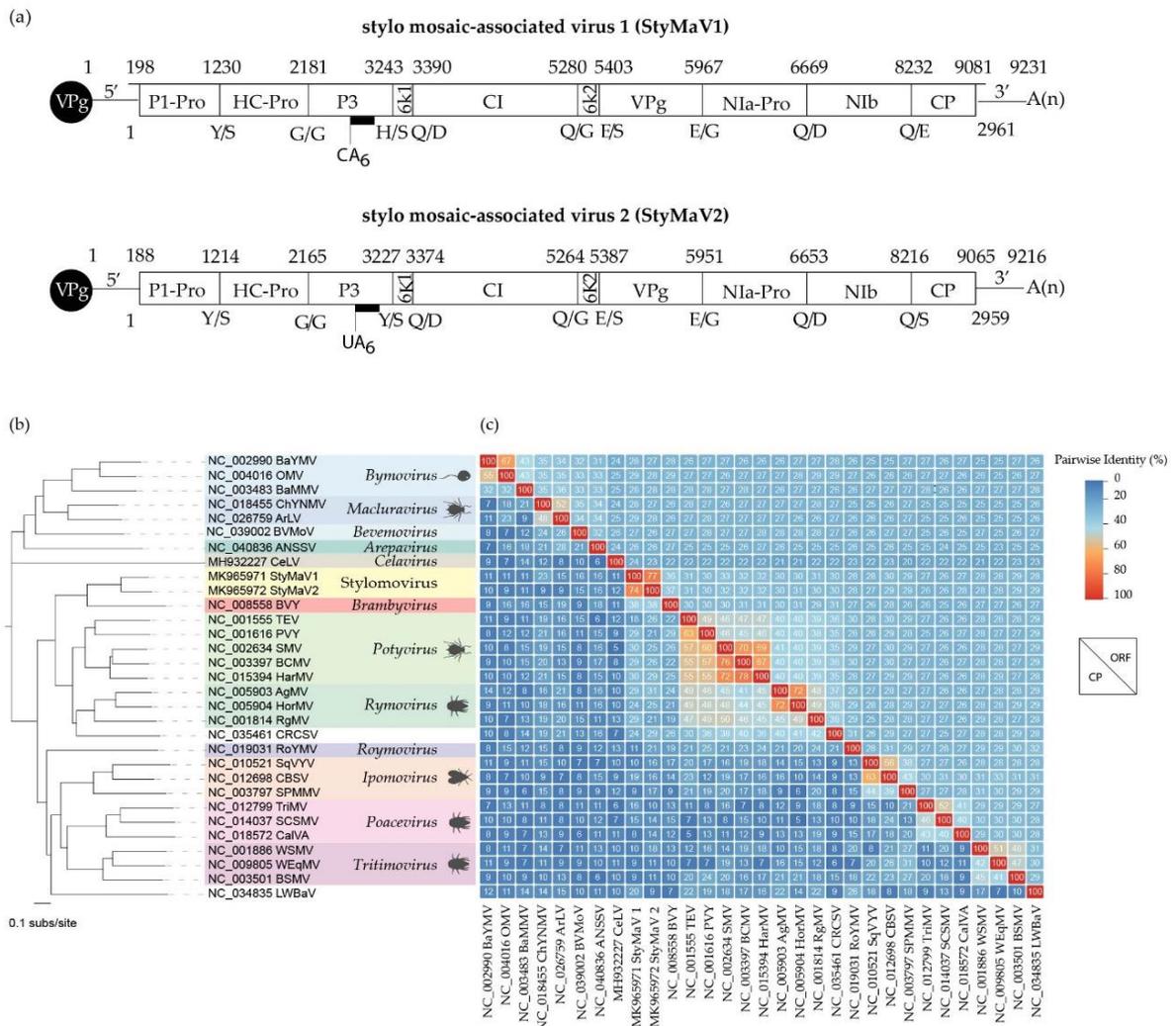
Differently, the NIa-Pro cleaves itself (NIa/NIb) at Q/D, while this cleavage usually occurs at Q/G, Q/S, Q/H, Q/N, Q/A, Q/T, Q/M, Q/E, H/G or E/S for other potyvirids (Adams *et al.*, 2005a). The P3/6K1 and NIb/CP cleavages sites vary even between StyMaV-1 and StyMaV-2, while all the others are the same for both viruses (Fig. 2a). Amino acid (aa) sequences of CP and polyproteins from StyMaV-1 and StyMaV-2 were aligned with those of other members of the family *Potyviridae* by MAFFT software (Kato and Standley, 2013). A heatmap with identity values was then built by SDT v. 1.2 program (Fig. 2c).

StyMaV-1 and StyMaV-2 shared highest identity with each other, 73% aa identity for CP and 77% aa identity for polyprotein. Currently, the threshold for new species demarcation in the family *Potyviridae* is 80% for CP aa sequence identity and 76% for nt sequence identity of CP or over the entire genome (Adams *et al.*, 2005b). With these results, StyMaV-1 and StyMaV-2 represent two new species within the family *Potyviridae*. With other potyvirids, StyMaV-1 and StyMaV-2 shared highest CP aa identity with blackberry virus Y (genus *Brambyvirus*) of only 41%. Due to this high genetic divergence, we also suggest the creation of the genus “*Stylomovirus*” in the family *Potyviridae*.

Phylogenetic trees made using the Neighbor Joining (NJ) method with 1000 replicate-bootstrap, available on Geneious 11.0.5 program, showed that StyMaV-1 and StyMaV-2 clustered in a monophyletic group (Fig. 2b). BVY was one of the closest known viruses to them in accordance with the CP and polyprotein identity matrices. Finally, aligned potyvirid genomes were submitted to recombination analyses employing the methods implemented in RDP version 4.36 (Martin *et al.*, 2015). No evidence of recombination involving StyMaV-1 and StyMaV-2 and members of the potyvirid genera has been found.

As an attempt to determine host ranges of StyMaV-1 and StyMaV-2, leaf extracts of infected *S. guianensis* ground in phosphate buffer pH 7.0 (containing sodium metabisulphite) were mechanically inoculated onto *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Datura stramonium*; and the legumes *Cajanus cajan*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão and cv. Bela dusted with carborundum. Plants were kept in the greenhouse until 30 dpi. The inoculation experiment was independently repeated three times.

As an overall result, only 1 out of 9 *N. benthamiana* plants and 2 out of 18 *G. max* (soybean) plants displayed mild crinkles on systemic leaves. RT-PCR was performed using total RNA of inoculated plants to confirm the presence or absence of StyMaV-1 and StyMaV-2. Only symptomatic plants were infected and always by both viruses. Unexpectedly, back inoculation of leaf sap from these infected indicator plants (3 plants) onto other indicator plants of the same species failed. We also concluded that *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão was recalcitrant to mechanical inoculation for StyMaV-1 and StyMaV-2.



**Figure 2: Genomic organization of new stylo-infecting viruses and their genetic relationship with other potyvirids.** (A) Annotation of StyMaV-1 and StyMaV-2 genomes. The numbers above the schemes indicate the position of nucleotides. The amino acids of cleavage sites are indicated below the schemes. The black rectangles represent PIPO ORF with the respective conserved motif. (B) Phylogenetic tree based on aa sequences of potyvirus polyproteins. Viruses with no genus are unassigned. (C) Pairwise alignment matrices of CP and polyproteins aa sequences from viruses classified in different genera of the family *Potyviridae*. Color scale from bright blue to intense red indicates from lowest to highest (100%) identity values, respectively. Names of genera and viruses used in these analyses: *Bymovirus*, barley yellow mosaic virus (RNA 1), BaYMV, NC\_002990; *Bymovirus*, barley mild mottle virus (RNA 1), BaMMV, NC\_003483; *Bymovirus*, oat mosaic virus (RNA 1), OMV, NC\_004016; *Macluravirus*, chinese yam necrotic mosaic virus, ChYNMV, NC\_018455; *Macluravirus*, artichoke latent virus, ArLV, NC\_026759; *Bevevirus*, bellflower veinal mottle virus, BVMoV, NC\_039002; *Arepavirus*, areca palm necrotic spindle-spot virus, ANSSV, NC\_040836; *Celavirus*, celery latent virus, CeLV, MH932227; MK965971 StyMaV1; MK965972 StyMaV2; NC\_008558 BVMV; NC\_001555 TEV; NC\_001616 PVY; NC\_002634 SMV; NC\_003397 BCMV; NC\_015394 HarMV; NC\_005903 AgMV; NC\_005904 HorMV; NC\_001814 RgMV; NC\_035461 CRCSV; NC\_019031 RoYMV; NC\_010521 SgYVY; NC\_012698 CBSV; NC\_007597 SPMNV; NC\_012799 TrMV; NC\_014037 SCSMV; NC\_018572 CaVA; NC\_001866 WSMV; NC\_009805 WEqMV; NC\_003501 BSMV; NC\_034835 LWBaV.

'*Stylomovirus*', stylo mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, MK965971; '*Stylomovirus*', stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, MK965972; *Brambyvirus*, blackberry virus Y, BVY, NC\_008558; *Potyvirus*, tobacco etch virus, TEV, NC\_001555; *Potyvirus*, potato virus Y, PVY, NC\_001616; *Potyvirus*, soybean mosaic virus, SMV, NC\_002634; *Potyvirus*, bean common mosaic virus, BCMV, NC\_003397; *Potyvirus*, hardenbergia mosaic virus, HarMV, NC\_015394; *Rymovirus*, agropyron mosaic virus, AgMV, NC\_005903; *Rymovirus*, hordeum mosaic virus, HorMV, NC\_005904; *Rymovirus*, ryegrass mosaic virus, RgMV, NC\_001814; Unassigned, reed chlorotic stripe virus, CRCSV, NC\_035461; *Roymovirus*, rose yellow mosaic virus, RoYMV, NC\_019031; *Ipomovirus*, squash vein yellowing virus, SqVYV, NC\_010521; *Ipomovirus*, cassava brown streak virus, CBSV, NC\_012698; *Ipomovirus*, sweet potato mild mottle virus, SPMNV, NC\_003797; *Poacevirus*, triticum mosaic virus, TriMV, NC\_012799; *Poacevirus*, sugarcane streak mosaic virus, SCSMV, NC\_014037; *Poacevirus*, Caladenia virus A, CalVA, NC\_018572; *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, WSMV, NC\_001886; *Tritimovirus*, wheat eglid mosaic virus, WEqMV, NC\_009805; *Tritimovirus*, brome streak mosaic virus, BSMV, NC\_003501; Unassigned, Logan witches broom-associated virus, LWBaV, NC\_034835.

StyMaV-1 and StyMaV-2 had been always detected co-infecting host plants. In addition to the stylos plants collected in the field, these viruses were also detected together after mechanical inoculation in soybean and *N. benthamiana*. Due to their narrow host range or low mechanical transmission efficiency, biological isolation of these two viruses using plants from different botanical families seems unfeasible. The morphology and biochemical composition of *S. guianensis* also limit the mechanical inoculation assay since leaves are highly fibrous and trichomic, have viscous mesophyll, and leaf saps rapidly oxidize.

Although successful vector transmission experiments could not be performed, it is worth mentioning that symptomatic stylos were infested with whiteflies in the field. Other typical potyviriid vectors, such as aphids and mites, were also observed but in a much lower frequency. If StyMaV-1 and StyMaV-2 are in fact vectored by one of these insects, a non-circulative relationship is expected (Whitfield *et al.*, 2015). Thus, a semi-persistent transmission manner, e.g. ipomoviruses, would be rather expected than a persistent transmission. The precise relationship between StyMaV-1 and StyMaV-2 with insect vectors, nevertheless, remains to be elucidated.

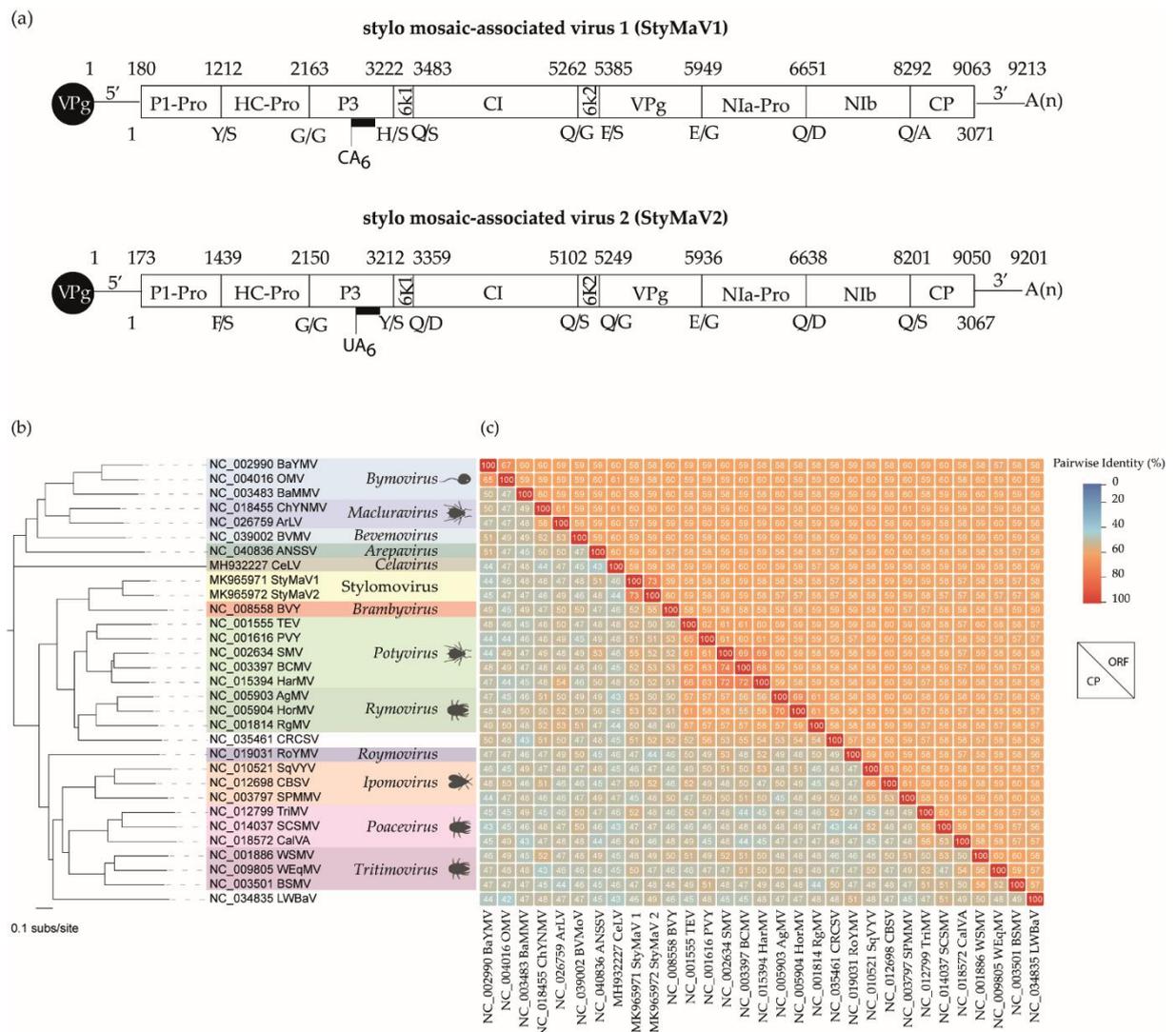
## FUNDING

This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198257>

## SUPPLEMENTARY DATA-1



**Figure S.1: Genomic organization of new stylo-infecting viruses and their genetic relationship with other potyvirids.** (A) Annotation of StyMaV-1 and StyMaV-2 genomes. The numbers above the schemes indicate the position of nucleotides. The amino acids of cleavage sites are indicated below the schemes. The black rectangles represent PIPO ORF with the respective conserved motif. (B) Phylogenetic tree based on nt sequences of potyvirus polypeptides. Viruses with no genus are unassigned. (C) Pairwise alignment matrices of CP nt and full genome sequences from viruses classified in different genera of the family *Potyviridae*. Color scale from bright blue to intense red indicates from lowest to highest (100%) identity values, respectively. Names of genera and viruses used in these analyses: *Bymovirus*, barley yellow mosaic virus (RNA 1), BaYMV, NC\_002990; *Bymovirus*, barley mild mottle virus (RNA 1), BaMMV, NC\_003483; *Bymovirus*, oat mosaic virus (RNA 1), OMV, NC\_004016; *Macluravirus*, chinese yam necrotic mosaic virus, ChYNMV, NC\_018455; *Macluravirus*, artichoke latent virus, ArLV, NC\_026759; *Bevemovirus*, bellflower veinal mottle virus, BVMoV, NC\_039002; *Arepavirus*, areca palm

necrotic spindle-spot virus, ANSSV, NC\_040836; *Celavirus*, celery latent virus, CeLV, MH932227; '*Stylomovirus*', stylo mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, MK965971; '*Stylomovirus*', stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, MK965972; *Brambyvirus*, blackberry virus Y, BVY, NC\_008558; *Potyvirus*, tobacco etch virus, TEV, NC\_001555; *Potyvirus*, potato virus Y, PVY, NC\_001616; *Potyvirus*, soybean mosaic virus, SMV, NC\_002634; *Potyvirus*, bean common mosaic virus, BCMV, NC\_003397; *Potyvirus*, hardenbergia mosaic virus, HarMV, NC\_015394; *Rymovirus*, agropyron mosaic virus, AgMV, NC\_005903; *Rymovirus*, hordeum mosaic virus, HorMV, NC\_005904; *Rymovirus*, ryegrass mosaic virus, RgMV, NC\_001814; Unassigned, reed chlorotic stripe virus, CRCSV, NC\_035461; *Roymovirus*, rose yellow mosaic virus, RoYMV, NC\_019031; *Ipomovirus*, squash vein yellowing virus, SqVYV, NC\_010521; *Ipomovirus*, cassava brown streak virus, CBSV, NC\_012698; *Ipomovirus*, sweet potato mild mottle virus, SPMMV, NC\_003797; *Poacevirus*, triticum mosaic virus, TriMV, NC\_012799; *Poacevirus*, sugarcane streak mosaic virus, SCSMV, NC\_014037; *Poacevirus*, Caladenia virus A, CalVA, NC\_018572; *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, WSMV, NC\_001886; *Tritimovirus*, wheat eqlid mosaic virus, WEqMV, NC\_009805; *Tritimovirus*, brome streak mosaic virus, BSMV, NC\_003501; Unassigned, Logan witches broom-associated virus, LWBaV, NC\_034835.

## SUPPLEMENTARY DATA- 2

**Table S1:** The cleavage sites were predicted in the stylos based on functional assays from other potyvirids. Conserved domains were observed between StyMaV-1 and StyMaV-2.

Cleavage sites	Stylomovirus	
	StyMaV-1	StyMaV-2
P1/HC-Pro	DIDFY/SEDKK	P1/HC-Pro
HC-Pro/P3	EYTVG/GISSK	HC-Pro/P3
P3/6K1	KDLVH/SANKF	P3/6K1
6K1/CI	LIQFQ/DSTDA	6K1/CI
CI/6K2	LIKFQ/GKEDN	CI/6K2
6K2/VPg	FVVVE/SVYMY	6K2/VPg
VPg/NIa	IFEFE/GSGKV	VPg/NIa
NIa/NIb	KFTFQ/DGTVG	NIa/NIb
NIb/CP	HITFQ/ESPLQ	NIb/CP

## REFERENCES

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae* (2005a). *Molecular Plant Pathology*. 6: 471–487p. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00296.x>

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae* (2005b). *Archives of Virology*. 150: 459–479p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0440-6>

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMANN, D. J. Basic local alignment search tool (1990). *Journal Molecular Biology* 215: 403–410p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L.; SALES, M. F. L. Estilosantes Campo Grande: Leguminosa Forrageira Recomendada para Solos Arenosos do Acre (2010). Circular técnica (55), 1–12. Embrapa 1. In: [http://iquiri.cpfac.embrapa.br/pdf/circtec\\_55\\_02022011\\_br.pdf](http://iquiri.cpfac.embrapa.br/pdf/circtec_55_02022011_br.pdf)

BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology (2013). *Viruses* 6: 106–136p. DOI: <https://doi.org/10.3390/v6010106>

BERNARDO, P.; CHARLES-DOMINIQUE, T.; BARAKAT, M.; ORTET, P.; FERNANDEZ, E.; FILLOUX, D.; HARTNADY, P.; REBELO, T. A.; COUSINS, S. R.; MESLEARD, F.; COHEZ, D.; YAVERCOVSKI, N.; VARSANI, A.; HARKINS, G. W.; PETERSCHMITT, M.; MALMSTROM, C. M.; MARTIN, D. P.; ROUMAGNAC, P. Geometagenomics illuminates the impact of agriculture on the distribution and prevalence of plant viruses at the ecosystem scale (2018). *ISME J.* 12: 173–184p. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.155>

CAPOBIANCHI, M. R.; GIOMBINI, E.; ROZERA, G. Next-generation sequencing technology in clinical virology (2013). *Clin. Microbiol. Infect.* 19: 15–22p. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12056>

CHENG, G.; DONG, M.; Xu, Q.; PENG, L.; YANG, Z.; WEI, T.; XU, J. Dissecting the molecular mechanism of the subcellular localization and cell-to-cell movement of the sugarcane mosaic virus P3N-PIPO (2017). *Sci. Rep.* 7: 1–11p. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10497-6>

CHUNG, B. Y. W.; MILLER, W. A.; ATKINS, J. F.; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae* (2008). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 5897–5902p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0800468105>

da SILVA, L. A.; OLIVEIRA, A. S.; MELO, F. L.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; RESENDE, F. V.; RESENDE, R. O.; RIBEIRO, B. M. A new virus found in garlic virus complex is a member of possible novel genus of the family *Betaflexiviridae* (order Tymovirales) (2019). *Peer Journal*, 1–11p. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.6285>

DUTRA, V. F.; LIMA, C. P.; GARCIA, F. C. P.; LIMA, H. C.; SARTORI, A. L. B. Geographic distribution patterns of Leguminosae and their relevance for the Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil (2014). *Biota Neotrop.* 14 (1): e20133937. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06033937>

JANK, L.; VALLE, C. B.; RESENDE, R. Brazilian society of plant breeding. Printed in Brazil breeding tropical forages Breed Tropical Forages Crop Breed (2011). *Appl. Biotechnol.* 1: 27–34p.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvement's in performance and usability (2013). *Molecular Biology Evolution*, 30(4): 772-780p. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

LAMOUNIER, T. A. da C.; de OLIVEIRA, L. M.; de CAMARGO, B. R.; RODRIGUES, K. B.; NORONHA, E. F.; RIBEIRO, B. M.; NAGATA, T. Production of Brazilian human norovirus VLPs and comparison of purification methods (2015). *Braz. J. Microbiol.* 46: 1265–1268p. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140925>

MAIA, I. G.; HAENNI, A.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein (1996). *Journal General Virology*, 77: 1335–1341p. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-7-1335>

MARTIN, D.P.; MURRELL, B.; GOLDEN, M.; KHOOSAL, A.; MUHIRE, B. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes (2015). *Virus Evolution*, 1: vev003. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>

MARTÍNEZ, F.; RODRIGO, G.; ARAGONÉS, V.; RUIZ, M.; LODewIJK, I.; FERNANDÉZ, U.; ELENA, S. F.; DARÓS, J. A. Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection (2016). *BMC Genomics* 17 (87): 1–13p. DOI: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2394-y>

MARTÍNEZ, R. T.; de ALMEIDA, M. M. S.; RODRIGUEZ, R.; de OLIVEIRA, A. S.; MELO, F. L.; RESENDE, R. O. Identification and genome analysis of tomato chlorotic spot virus and dsRNA viruses from coinfecting vegetables in the Dominican Republic by high-throughput sequencing (2018). *Viol. J.* 15: 1–9p. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0931-9>

MEDEIROS, E. C. da S. & FLORES, A. S. The genus *Stylosanthes* (Leguminosae) in Roraima, Brazil (2014). *Rodriguiésia* 65 (1): 235–244p. DOI: <https://doi.org/10.1590/S2175-78602014000100016>

MERTEN, G. H. & MINELLA, J. P. G. The expansion of Brazilian agriculture: soil erosion scenarios (2013). *Int. Soil Water Conserv. Res.* 1 (3): 37–48p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-6339\(15\)30029-0](https://doi.org/10.1016/S2095-6339(15)30029-0)

MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation (2014). *PLoS ONE*. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>

OLSPERT, A.; CHUNG, B. Y.; ATKINS, J. F.; CARR, J. P.; FIRTH, A. E. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyviridae* (2015). *EMBO Rep.* 16: 995–1004p. DOI: <https://doi.org/10.15252/embr.201540509>

ORÍLIO, A. F.; BLAWID, R.; COSTA, G. A.; GOMES, S. S. V. S. F.; NAGATA, T.; MADEIRA, N. R.; INOUE-NAGATA, A. K.; RESENDE, R. O. High-throughput sequencing reveals a novel closterovirus in arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) (2018). *Archives Virology* 163: 2547–2550p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3863-1>

RODAMILANS, B.; VALLI, A.; MINGOT, A.; SAN-LEÓN, D.; BAULCOMBE, D.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCÍA, J. A. RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the *Potyviridae* Family (2015). *Journal of Virology* 89: 6965–6967p. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00337-15>

ROHOZKOVÁ, J. & NAVRÁTIL, M. P1 peptidase - a mysterious protein of family *Potyviridae* (2011). *Journal of Bioscience*, 36 (1): 189–200p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9020-6>

ROSE, H.; DORING, I.; VETTEN, H. J.; MENZEL, W.; RICHERT-POGGELER, K. R.; MAISS, E. Complete genome sequence and construction of an infectious full-length cDNA clone of celery latent virus – an unusual member of a putative new genus within the *Potyviridae* (2019). *Journal General Virology*, 100: 308–320p. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001207>

SCHULTZE-KRAFT, R.; RAO, I. M.; PETERS, M.; CLEMENTS, R. J.; BAI, C.; LIU, G. Tropical forage legumes for environmental benefits: an overview (2018). *Tropical Grasslands-Forrages Tropicales*, 6: 1–14p. DOI: [https://doi.org/10.17138/TGFT\(6\)1-14](https://doi.org/10.17138/TGFT(6)1-14)

SILVA, K. N.; NICOLINI, C.; SILVA, M. S.; FERNANDES, C. D.; NAGATA, T.; RESENDE, R. O. First report of johnsongrass mosaic virus (JGMV) infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil (2013). *Plant Disease*, 97: 1003p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0013-PDN>

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions (2001). *Virus Research*, 74: 157–175p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00220-9)

VERCHOT, J.; HERNDON, K. L.; CARRINGTON, J. C. Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis (1992). *Virology*, 190: 298–306p. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)91216-H](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)91216-H)

WHITFIELD, A. E.; FALK, B. W.; ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses (2015). *Virology*, 479–480p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>

YANG, K.; RAN, M.; LI, Z.; HU, M.; ZHENG, L.; LIU, W.; JIN, P.; MIAO, W.; ZHOU, P.; SHEN, W.; CUI, H. Analysis of the complete genomic sequence of a novel virus, areca palm necrotic spindle-spot virus, reveals the existence of a new genus in the family *Potyviridae* (2018). *Archives of Virology*, 163: 3471–3475p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3980-x>

### CHAPTER 3:

#### **MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A NEW *ROYMOVIRUS* (*POTYVIRIDAE*) CO-INFECTING THE FORAGE LEGUME *STYLOSANTHES GUIANENSIS***

Jamile Mendes de Souza<sup>a</sup>, Athos Silva de Oliveira<sup>a</sup>, Fernando Lucas Melo<sup>a</sup>, Rita de Cássia Pereira-Carvalho<sup>a</sup>, Celso Dornellas Fernandes<sup>b</sup> and Renato Oliveira Resende<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, University of Brasilia, CEP 70910-900, Brasilia, DF, Brazil

<sup>b</sup> Embrapa Beef Cattle, CEP 79106550, Campo Grande, MS, Brazil

The work will be submitted in a modified version to *Virus Research*

## ABSTRACT

In this work, the complete nucleotide sequence of a new member of the *Potyviridae* family isolated from stylo (*Stylosanthes guianensis*) in Brazil was elucidated. Two samples were collected and submitted to high performance sequencing (HTS) in the Platform Illumina HiSeq 2000. The sequence obtained was assembled using the CLC Genomics Workbench 7.0 program and after that, were analyzed in the BLASTX program against the database (GenBank). This isolate was called Stylo yellow mosaic virus (StyYMV), and its genome is 9,621 nucleotides long and encodes a 3,207 amino acids polyprotein that is predicted to be proteolytically cleaved into 10 mature peptides. Phylogenetic analysis shows that StyYMV represents a new species and is most closely related to *Rose yellow mosaic virus* (RoYMV). The presence of StyYMV in stylo was confirmed by specific RT-PCR assays targeting the coat protein (CP). The fragments were amplified and sequenced by the Sanger method. Other two viruses were discovered in this sequencing and were published previously (StyMaV-1 and StyMaV-2). Overall, here we report the complete genome of a new virus (StyYMV) infecting *S. guianensis* plants in Brazil, that should be considered members of the genus *Roymovirus* sharing 80% nt identity in the total genome. According to currently accepted criteria for genus demarcation, this virus should be assigned as a new species in the recently approved genus, *Roymovirus*, in the *Potyviridae* family. Transmission assays showed that this virus is transmitted by whiteflies *Bemisia tabaci*: biotype B (MEAM 1) postulating these insects as natural vectors of StyYMV.

**Keywords:** *Stylosanthes guianensis*, *Potyviridae*, *Roymovirus*, Stylo yellow mosaic virus, StyYMV.

In Brazil, forage crops represent large areas of tropical pasture for cattle feeding. These pastures can be natural or planted and are composed of grasses and forage legumes. They are essential for the production and quality of bovine meat and milk (Andrade *et al.*, 2010). The use of forage legumes of the genus *Stylosanthes* is important in the country due to its nutritional value and great potential of nitrogen fixation being able to grow in very sandy regions, being very resistant to pathogens, free of management problems and absent from accidents and biological problems that have impaired areas that are destined to livestock (Jank *et al.*, 2011; Merten and Minella, 2013).

In recent years, the cultivation area of stylo in Brazil has been increasing; but the reports of phytopathological problems, such as the occurrence of viruses in this crop, are still limited. To date, only two potyviruses have been found in stylo in Brazil: Stylo mosaic-associated virus 1 (StyMaV-1) and Stylo mosaic-associated virus 2 (StyMaV-2), tentative members of a proposed new genus, *Stymolovirus* (de Souza *et al.*; 2021). Concerning viruses, symptoms such as mosaic, yellowing, and dwarfing have been reported on forage plants resembling those mainly caused by potyvirus infections. Since these symptoms can compromise plant development, they can also impact on the nutritional value of a given forage crop used for animal feeding (Silva *et al.*, 2013).

*Potyviridae* is a large family of plant viruses, some of them causing serious diseases in important crops. Viruses included in this family are classified into twelve genera harboring 235 species and have a monopartite or bipartite single-stranded positive-sense RNA (ssRNA) genome ranging from 8-11 kb in size with a poly(A) tail. All monopartite members of the family form flexuous filamentous particles with a 700–900 nm length. These viruses are transmitted mainly by arthropods (Wylie *et al.*, 2017).

Several techniques have been used to detect virus infections, but currently, advances in high-throughput sequencing technology (HTS) have led to unprecedented advancements in the detection and identification of plant viruses from infected plants, even if they are asymptomatic (Aerle and Santos, 2017). HTS has developed into a powerful tool and is changing the way we understand and address viruses, particularly in the areas of genome sequencing, evolution, ecology, biodiversity and virus discovery (Howell *et al.*, 2011). HTS has proved to be a fast and precise method for detection, identification and quantification of known or novel viruses (Barba *et al.*, 2014).

Recently, it was observed in the forage legume *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão, virus-like mosaic, yellowing and chlorotic leaf spots symptoms (fig. 1) in the experimental field

of EMBRAPA Beef Cattle Station in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil in 2014. Two samples were collected and were pooled for semi-purification that was performed by differential centrifugation of viral particles, followed by total RNA extraction as described by Oliveira *et al* (2017). In the present study, we used HTS to investigate the possible presence of viruses in stylo samples performed according to Blawid *et al* (2017). The presence of a new potyvirus was identified by HTS and further confirmed using RT-PCR of infected plants. The newly identified virus was tentatively named Stylo yellow mosaic virus (StyYMV).

Ten grams of stylo leaves were grounded with liquid nitrogen and homogenized in 100 mL of 0,1M phosphate buffer (pH 8.0) with 1 mM EDTA and 0.2 %  $\beta$ -mercaptoethanol, followed by filtration with tissue cloth. The filtrate was centrifuged for 20 min at 3,836 x g for removal of cellular debris. The supernatant was then ultra-centrifuged at 33,000 x g for 2 hours through a 20% sucrose cushion (de Souza *et al.*, 2021). Pellets were processed for RNA extraction with RNeasy plant mini kit (Qiagen, Hilde, Germany) following the manufacturer's instruction.

The pool RNA samples were sequenced and whole transcriptome shotgun sequencing of the RNA pool was done using an Illumina Hi Seq 2000 platform at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea), which ended up in the production of about 40 million reads. The paired-ends reads were quality-filtered, the adapter sequences were removed, and contigs were assembled de novo using CLC Genomics Workbench version 6.0.3.

Contigs covering virus-derived genomes were built by BLASTn and BLASTx (Altschul *et al.*, 1990) searches against the virus reference database available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The paired-end reads were trimmed and assembled using CLC Genomics Workbench 7.0 software. At the end, a putative new virus genome genetically related to members of the genus *Roymovirus* (*Potyviridae* family) were identified and annotated using Geneious 11.0.5 program using the reference genome of RoYMV (NC\_019031).



**Figure 1:** Leaves of *S. guianensis* cv. Mineirão showing virus-like yellow mosaic and chlorotic leaf spots symptoms in the experimental field.

Since 2014, StyYMV have been always detected by RT-PCR co-infecting Stylomovirus (StyMaV-1 and StyMaV-2) symptomatic *S. guianensis* cv. Mineirão collected in other states of Brazil like Mato Grosso do Sul (MS), Bahia (BA) and in Brasilia (DF), Federal District (de Souza *et al.*, 2021). This virus was detected in 2014 (3 out of 5 samples in Campo Grande, MS), 2015 (1 out of 4 samples in Lençóis, BA), 2016 (3 out of 4 samples in Campo Grande, MS), 2017 (2 out of 4 samples in Campo Grande, MS), 2018 (5 out of 10 samples in Planaltina, DF), and in symptomatic *S. guianensis* cv. Bela collected in 2019 (2 out of 2 samples in Campo Grande, MS).

The presence of this rose-like (StyYMV) in stylo plants was confirmed in 16 samples out of 29 using RT-PCR, which amplify coat protein (CP) genes. RT-PCR reactions were performed with primers FWMAV-3 (5'-GAA TTC GAT CGA GGG CTA CCA GTG CG-3') and RVMAV-3 (5'-CTC GAG TTA TCT GTA AGA CCT GCT TT-3') for StyYMV. The 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends kit (Thermo Fisher Scientific) was used to determine the 5' end of the viral RNA genome. The polyadenylation technique was used for determination of the 3' end according Sallés and Strickland (1995).

For RACE-PCR specific reverse primer (5'-ATG GTG CTT GGC TTG GAC AC-3') was used for cDNA synthesis of StyYMV. Homopolymeric tail was added to the cDNA strands using terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and dCTP. First, PCRs were performed with 5' RACE Abridged Anchor Primer (supplied in the kit) and the reverse primers 5'-GTT GGA CAG TAG GAC AGC CC-3'. Second, PCRs were performed with Abridged Universal Amplification Primer (AUAP; supplied in the kit) and the internal specific reverse primers 5'-ACA GCG TTG TAA GCC TTC GA-3'. At the end, the 5' untranslated regions (UTR) of StyYMV was 24 nt.

The 3' end was determined by cDNA synthesis using SuperScript III Reverse-Transcriptase with anchor primer dT50M10: 5'-AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA T<sub>50</sub>-3' (Lamounier *et al.*, 2015). Forward virus specific primer 5'-GGA TCC GAT CGA GGG CTA CCA GTG CG-3' was designed to anneal on the CP gene of StyYMV. This primer was combined with reverse anchor primer M10 (5'-AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA-3') for 3' end amplification by PCR. At the end, the 3' untranslated region (UTR) of StyYMV was 172 nt excluding the poly(A) tail.

Platinum Taq DNA Polymerase was used in all PCRs following the manufacturer's protocol. All PCR products were cloned into pGEM-T Easy following the manufacturer's protocol and sequenced at Macrogen Inc. It is important to mention that amplification of CP

genes and 3' and 5'UTRs successfully confirmed the assembled genomes. As seen in fig. 2A, StyYMV full genome was 9,621 nt long (assembled from 1820 reads, mean coverage of 60x) with two open reading frames (ORF). The StyYMV ORF 1 spans over 9,321 nt and encodes a large polyprotein of 3,107 aa.

The StyYMV has an ORF 2, with 195 nt, that overlaps the P3-encoding region of the ORF 1 and encodes PIPO (Pretty Interesting *Potyviridae* ORF). PIPO is conserved in the genomes of all potyvirids and was shown to depend on programmed transcriptional slippage at a conserved GA<sub>6-7</sub> sequence to be produced (Olsper *et al.*, 2015; Rodamilans *et al.*, 2015). To confirm if these alternative motifs are likely functional, the trimmed reads were mapped to StyYMV genomes and slippage events at each putative slip site sequences were detected at 3,08%.

The cleavage sites of StyYMV polyprotein were predicted and annotated in comparison with the type-species of each genus in the family *Potyviridae* (Robaglia *et al.*, 1989, Schubert *et al.*, 1999, Susaimuthu *et al.*, 2008, Rose *et al.*, 2019, Dombrovsky *et al.*, 2014, Fellers *et al.*, 2009, Stenger *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 2018, Seo *et al.*, 2017, Kondo and Fujita, 2012, Mollov *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 1999) (table S1). After proteolytic cleavage at specific sites, ten proteins were predicted: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb and CP (fig. 2A) (Wylie *et al.*, 2017). Thus, nine cleavage sites were also predicted based on functional assays from other potyvirids (Adams *et al.*, 2005a; Revers and García, 2015).

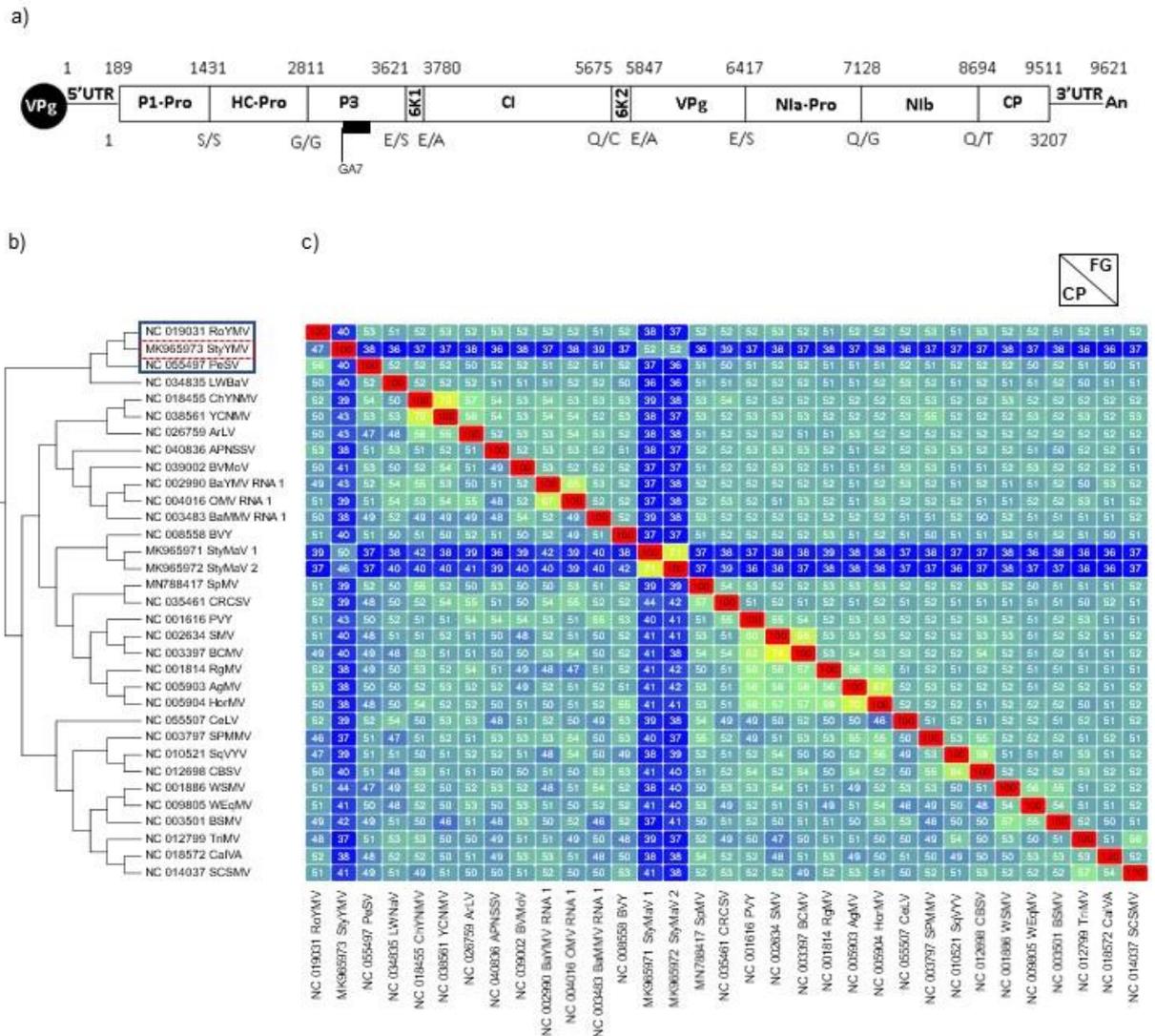
The P1-Pro and HC-Pro proteins act in *cis* cleaving themselves from the polyprotein at the P1-Pro/HC-Pro and HC-Pro/P3 junctions, respectively (Rohozková and Navrátil, 2011; Valli *et al.*, 2018). The HC-Pro protein of StyYMV has conserved cleavage site with other potyvirids, G/G (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2005a), and the P1 protein has cleavage site S/S that is different of other roymovirus like RoYMV (NC\_019031) and PeSV (MH379332) (Mollov *et al.*, 2013; Jover-Gil *et al.*, 2018).

The NIa-Pro protein acts in *cis*, cleaving itself (NIa/NIb), and in *trans*, cleaving other viral proteins out of the polyprotein (Adams *et al.*, 2005a; Martínez *et al.*, 2016; Gong *et al.*, 2020). The NIa-Pro cleaves itself (NIa/NIb) at Q/G, while this cleavage usually occurs at Q/G, Q/S, Q/H, Q/N, Q/A, Q/T, Q/M, Q/E, H/G or E/S for other potyvirids (Adams *et al.*, 2005a). The P3/6K1, 6K1/CI, CI/6K2, 6K2/VPg, VPg/NIa, NIb/CP have cleavages sites in E/S, E/A, Q/C, E/A, E/S and Q/T, respectively (Fig. 2A). Annotated genome was deposited on GenBank under accession number MK965973.

To determine the relationship between StyYMV and other potyviruses, the amino acid (aa) and nucleotide (nt) sequences of CP, full genome and polyproteins from StyYMV were aligned and compared with those of other members of the family *Potyviridae* by MAFFT software (Kato and Standley, 2013). Currently, the threshold for new species demarcation in the family *Potyviridae* is 80% for CP aa sequence identity and 76% for nt sequence identity of CP or over the entire genome (Adams *et al.*, 2005b).

A heatmap with identity values was then built by SDT v. 1.2 program (Muhire *et al.*, 2014) (Fig. 2C) and StyYMV shared highest identity with, 56% nt for CP and full genome with *Rose yellow mosaic virus* (NC\_019031). The aa sequence for CP shared highest identity with the type specie *Rose yellow mosaic virus* (NC\_019031), of genus *Roymovirus*, of 61,13% and only 39,29% with *Passiflora edulis symptomless virus* (MH379332), the other member of this genus (fig. S1). The BLASTp with the poliprotein showed shared highest identity (72,51%) with *Rose yellow mosaic virus* Minnesota isolate (JF280796).

Phylogenetic trees made using the Neighbor Joining (NJ) method with 1000 replicate-bootstrap, available on Geneious 11.0.5 program, showed that StyYMV clustered with roymovirus group (fig. 2B). RoYMV was one of the closest known viruses to them in accordance with the CP and full genome identity matrices. Finally, aligned potyviriid genomes were submitted to recombination analyses employing the methods implemented in RDP version 4.36 (Martin *et al.*, 2015). These results revealed that StyYMV represent a new specie within the genus *Roymovirus*.



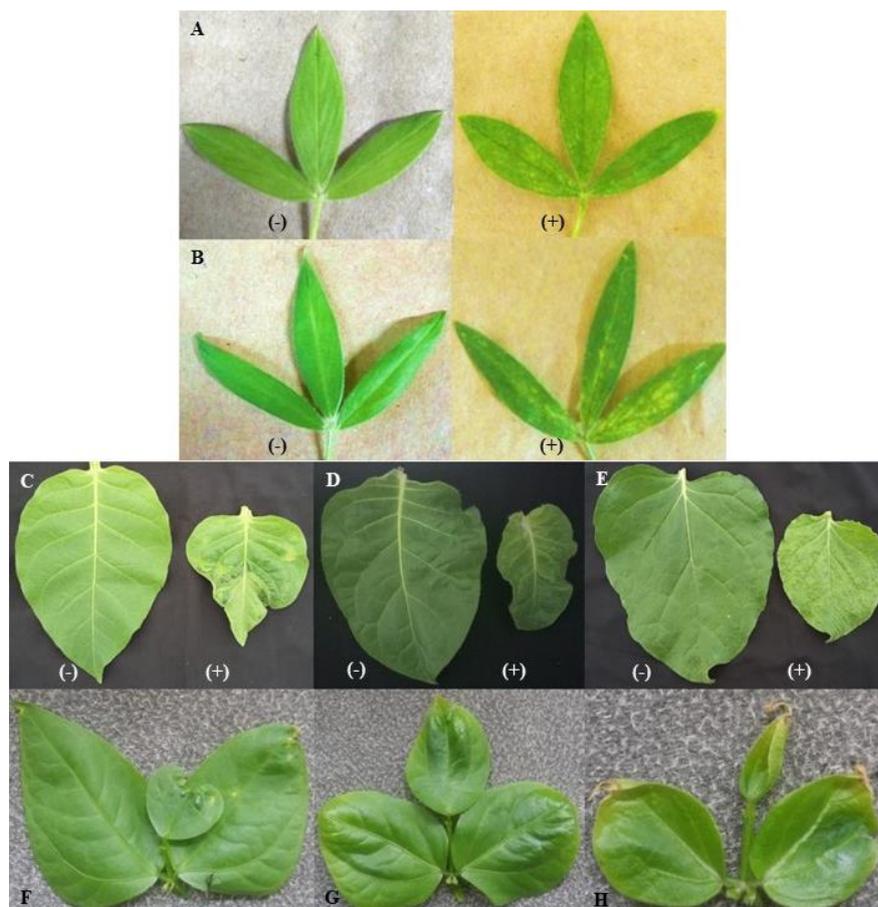
**Figure 2: Genomic organization of new stylo-infecting viruses and their genetic relationship with other potyvirids.** (A) Annotation of StyMYM genome. The numbers above the schemes indicate the position of nucleotides. The amino acids of cleavage sites are indicated below the schemes. The black rectangles represent PIPO ORF with the respective conserved motif. (B) Phylogenetic tree based on nt sequences of potyvirus full genomes. Viruses with no genus are unassigned. (C) Pairwise alignment matrices of capsid protein (CP) nt and full genome (FG) sequences from viruses classified in different genera of the family *Potyviridae*. Color scale from bright blue to intense red indicates from lowest to highest (100%) identity values, respectively. Names of genera and viruses used in these analyses: *Bymovirus*, barley yellow mosaic virus (RNA 1), BaYMYV, NC\_002990; *Bymovirus*, barley mild mottle virus (RNA 1), BaMMV, NC\_003483; *Bymovirus*, oat mosaic virus (RNA 1), OMV, NC\_004016; *Macluravirus*, chinese yam necrotic mosaic virus, ChYNMV, NC\_018455; *Macluravirus*, artichoke latent virus, ArLV, NC\_026759; *Macluravirus*, yam chlorotic necrotic mosaic virus, NC\_038561; *Bevemovirus*, bellflower veinal mottle virus, BVMoV, NC\_039002; *Arepavirus*, areca palm necrotic spindle-spot virus, ANSSV, NC\_040836; *Celavirus*, celery latent virus, CeLV, NC\_055507; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, MK965971; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, MK965972; *Brambyvirus*, blackberry virus Y, BVY, NC\_008558; *Potyvirus*, potato virus Y, PVY, NC\_001616; *Potyvirus*, soybean mosaic virus, SMV, NC\_002634; *Potyvirus*, bean common mosaic virus, BCMV, NC\_003397; *Rymovirus*, agropyron mosaic virus, AgMV, NC\_005903; *Rymovirus*, hordeum mosaic virus, HorMV, NC\_005904; *Rymovirus*, ryegrass mosaic virus, RgMV, NC\_001814; Unassigned, reed chlorotic stripe virus, CRCSV, NC\_035461; Unassigned, spartina mottle virus, SpMV, MN788417; *Roymovirus*, rose yellow mosaic virus, RoYMYV, NC\_019031; *Roymovirus*, passiflora edulis symptomless virus, PeSV, NC\_055497; *Ipomovirus*, squash vein yellowing virus, SqVYV, NC\_010521; *Ipomovirus*, cassava brown streak virus, CBSV, NC\_012698; *Ipomovirus*, sweet potato mild mottle virus, SPMV, NC\_003797; *Poacevirus*, triticum mosaic virus, TriMV, NC\_012799; *Poacevirus*, sugarcane streak mosaic virus, SCSMV, NC\_014037; *Poacevirus*, Caladenia virus A,

CalVA, NC\_018572; *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, WSMV, NC\_001886; *Tritimovirus*, wheat eglid mosaic virus, WEqMV, NC\_009805; *Tritimovirus*, brome streak mosaic virus, BSMV, NC\_003501; Unassigned, Logan witches broom-associated virus, LWBaV, NC\_034835.

As an attempt to determine host ranges of StyYMV, leaf extracts of infected *S. guianensis* ground in phosphate buffer pH 7.0, containing sodium metabisulphite and polyvinylpyrrolidone 40 (PVP 40), were mechanically inoculated onto *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Datura stramonium*; and the legumes *Cajanus cajan*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão and cv. Bela dusted with carborundum.

The inoculation experiment was independently repeated three times and the plants were kept in the greenhouse until 30 dpi. As an overall result, 17 out 20 of *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (Fig. 3A) and 15 out 20 of *Stylosanthes guianensis* cv. Bela plants displayed mosaic symptoms on systemic leaves (Fig. 3B). Only 4 out of 9 *N. tabacum* plants displayed leaf wrinkle (Fig 3C), 3 out of 9 *N. rustica* plants displayed chlorosis and leaf wrinkle (Fig. 3D) and 4 out of 9 *N. benthamiana* plants displayed chlorosis (Fig. 3E).

The StyYMV was able to be mechanically transmitted to other legumes such as common bean and cowpea, 3 out 15 of *V. unguiculata* (cowpea) plants displayed mild crinkles (Fig. 3F), 3 out of 15 *P. vulgaris* (common bean) BRS Pérola (Fig. 3G) and 4 out 15 *P. vulgaris* BRS Campeiro showed symptoms on systemic leaves (Fig. 3H). RT-PCR was performed using total RNA of inoculated plants to confirm the presence or absence of StyYMV. Only symptomatic plants were infected by StyYMV (Fig. 3). Upper, non-inoculated systemic leaves of all inoculated plants were analyzed by RT-PCR.



**Figure 3:** All samples were collected in greenhouse after mechanic inoculation and the first symptoms were observed 15 dpi. A) At right, *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão showing typical virus-induced yellow mosaic and chlorotic leaf spots symptoms. At left, negative control of *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão B) At right, *Stylosanthes guianensis* cv. Bela showing typical virus-induced yellow mosaic and chlorotic leaf spots symptoms. At left, negative control of *Stylosanthes guianensis* cv. Bela C) At right *Nicotiana tabacum* presented leaf wrinkle and chlorosis. At left the negative control D) At right *Nicotiana rustica* presented leaf wrinkle. At left the negative control E) At right *Nicotiana benthamiana* presented mosaic and leaf wrinkle. At left the negative control. F) *Vigna unguiculata* G) *Phaseolus vulgaris* cv. BRS Pérola H) *Phaseolus vulgaris* cv. BRS Campeiro. All beans (F, G and H) presented leaf deformation.

Concerning to potential insect vectors of StyYMV, it is worth mentioning that symptomatic stylos were infested with whiteflies in the field. Thus, a transmission assay was carried out using aviruliferous whiteflies of Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1, former B biotype), these insects are kept in cabbage plants and in a greenhouse in the Biological Experimental Station of University of Brasilia. The assays were conducted in a greenhouse and the plants were kept in clip cages, separating the positive control from the negative control.

Three plants with stylo cv. Mineirão containing the StyYMV isolate obtained through mechanical inoculation were, used as inoculum source for the transmission assay with whitefly. In each clip cage, a symptomatic plant containing the StyYMV-3 isolate was placed together with cabbage leaves containing whiteflies at different stages of development and used to acquire

the virus (Fig. S2). The same was done with asymptomatic and virus-free plants (confirmed by RT-PCR) used as negative control.

The whiteflies were kept for an acquisition period of 7 days and after this period, placed on two asymptomatic and virus-free plants (confirmed by RT-PCR) of both stylo cv. Mineirão as well as stylo cv. Bela. This was done both in clip cages containing the isolates and in those used as negative controls. These plants were kept for 45 days in the greenhouse and the first symptoms such as yellow mosaic, were observed 15 days after the transmission period. After this time, the symptomatic and asymptomatic plants were analyzed by RT-PCR.

The results showed that StyYMV was transmitted by whiteflies to stylo Mineirão and stylo Bela. All plants infected with isolate StyYMV presented yellow mosaic symptoms 15 days after being exposed to viruliferous whiteflies. These results confirmed that StyYMV was vectored by whitefly, and a non-circulative relationship (Whitfield *et al.*, 2015) or a semi-persistent transmission manner, e.g. ipomoviruses (Dombrovsky *et al.*, 2014) are expected.

Overall, a survey of viral diseases of forage legume was carried out in Brazil. *Sylosanthes guianensis* plants with mosaic symptoms on leaves were observed in some Brazilian states. Two samples of stylo were submitted to high performance sequencing (HTS) in the Plataforma Illumina HiSeq 2000 and the results showed the presence of three virus in this forage legume: Stylo mosaic-associated virus-1, Stylo mosaic-associated virus-2 as previously reported (de Souza *et al.*, 2021) and Stylo yellow mosaic virus, a new member of genus *Roymovirus* within *Potyviridae* Family, as demonstrated in this work.

A preliminary survey in GenBank using the contigs of StyYMV, revealed that this virus is closer of the type species *Rose yellow mosaic virus* of *Roymovirus* genus. Phylogenetic analyzes confirmed this virus as a new member of this genus. Biological assays showed that StyYMV can be mechanically transmitted to *N. tabaccum*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, different cultivars of *Stylosanthes guianensis* (Mineirão and Bela) and to other legumes such as common bean and cowpea. Finally, a transmission assay showed that whiteflies (MEAM 1) can transmit the virus and represent to be the natural vectors of StyYMV.

## FUNDING

This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

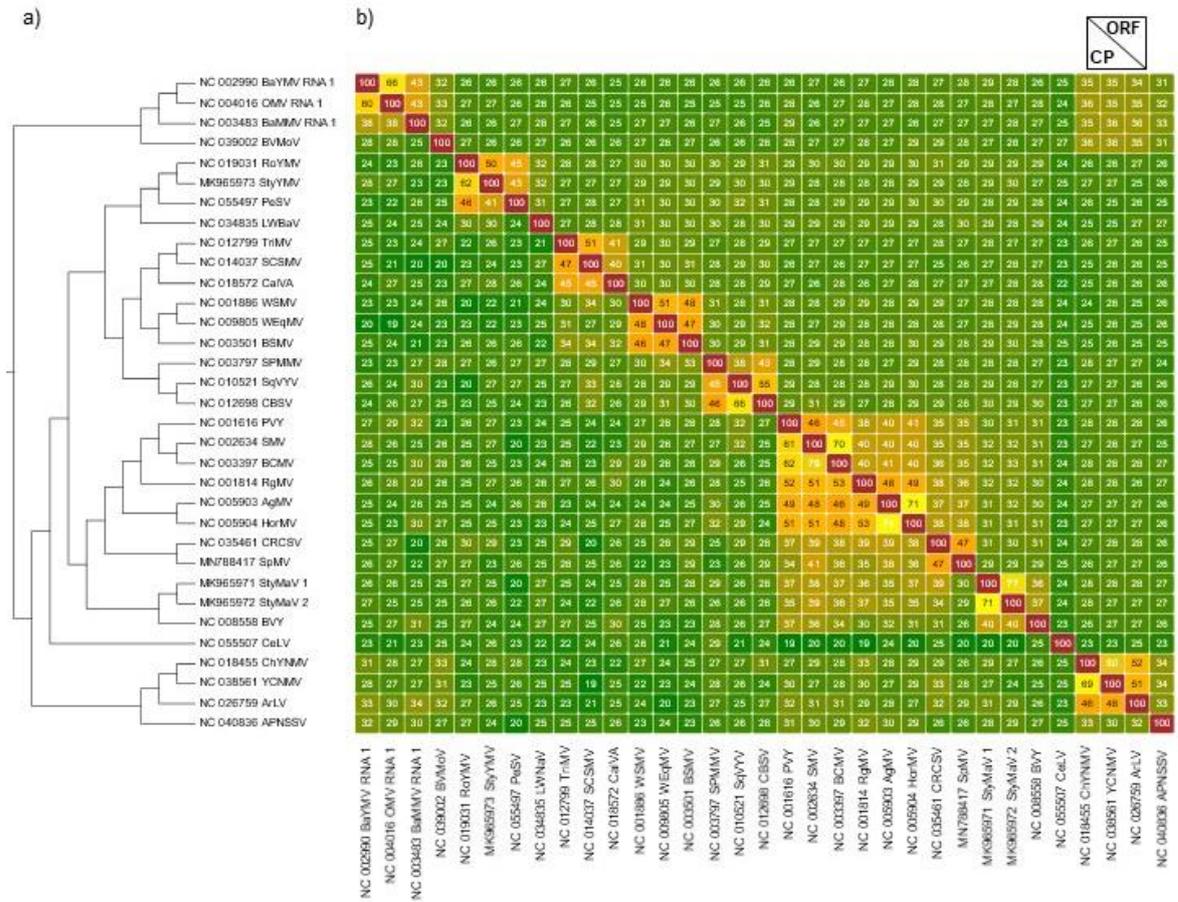
## SUPPLEMENTARY DATA- 1

**Table S1:** The cleavage sites were predicted in the Stylo yellow mosaic virus (StyYMV in red) based on functional assays from other potyvirids

Acronim●	Predicted proteins and cleavage sites according to genomic organization								
Monopartides genoms	P1-Pro/HC-Pro	HC-Pro/P3	P3/6K1	6K1/CI	CI/6K2	6K2/VPg	VPg/NlA-Pro	NlA-Pro/NlB	NlB/CP
<b>PVY</b>	F/S	G/G	Q/R	Q/S	Q/A	Q/G	E/A	Q/A	Q/A
<b>RgMV</b>	Y/S	G/G	Q/A	Q/S	Q/S	E/G	E/S	Q/S	E/A
<b>BVY</b>	Y/S	G/G	Q/S	Q/A	Q/N	E/A	E/G	Q/N	A/L
<b>CeLV</b>	*X/S	*X/G	L/N	S/G	*X/X	*X/X	*X/X	Q/E	Q/S
<b>SPMMV</b>	Y/A	G/G	H/G	H/G	H/G	H/G	H/G	H/G	H/G
<b>TriMV</b>	Y/S	G/G	H/A	H/A	H/G	H/G	H/S	H/N	H/S
<b>WSMV</b>	Y/G	G/G	Q/G	Q/S	Q/A	E/G	E/G	Q/S	E/S
<b>ANSSV</b>	-	G/G	Q/S	Q/A	Q/S	E/V	E/C	Q/M	Q/M
<b>BVMoV</b>	-	D/A	Q/A	Q/G	Q/M	E/G	E/M	Q/A	Q/I
<b>ChYNMV</b>	-	G/A	Q/A	Q/M	Q/A	E/M	E/M	Q/M	Q/M
<b>RoYMV</b>	Y/S	G/G	G/S	S/A	E/G	E/F	E/Q	Q/G	Q/M
<b>StyYMV</b>	<b>S/S</b>	<b>G/G</b>	<b>E/S</b>	<b>E/A</b>	<b>Q/C</b>	<b>E/A</b>	<b>E/S</b>	<b>Q/G</b>	<b>Q/T</b>

(●): PVY- *Potato virus Y (Potyvirus)*; RgMV- *Ryegrass mosaic virus (Rymovirus)*, BVY- *Blackberry virus Y (Brambyvirus)*, CeLV- *Celery latente virus (Celavirus)*, SPMMV- *Sweet potato mild mottle virus (Ipomovirus)*, TriMV- *Triticum mosaic virus (Poacevirus)*, WSMV- *Wheat streak mosaic virus (Tritimovirus)*, ANSSV- *Areca palm necrotic spindle-spot virus (Arepavirus)*, BVMoV- *Belflower veinal mottle virus (Bevemovirus)*, ChYNMV- *Chinese yam necrotic mosaic virus (Macluravirus)* and RoYMV- *Rose yellow mosaic virus (Roymovirus)*. (\*): Unconfirmed sites. The 'X' represents the presence of any amino acids (-): ANSSV, BVMoV, ChYNMV don't have the P1 protein and BaYMV don't has the HC-Pro protein. (‡): Proteins presente in the RNA 2 of the genus *Bymovirus*.

SUPPLEMENTARY DATA- 2



**Figure S1: Genomic organization of new stylo-infecting viruses and their genetic relationship with other potyvirids.** (A) Annotation of StyMYM genome. The numbers above the schemes indicate the position of nucleotides. The amino acids of cleavage sites are indicated below the schemes. The black rectangles represent PIPO ORF with the respective conserved motif. (B) Pairwise alignment matrices of capsid protein (CP) aa and polyprotein (ORF) sequences from viruses classified in different genera of the family *Potyviridae*. Color scale from bright blue to intense red indicates from lowest to highest (100%) identity values, respectively. Names of genera and viruses used in these analyses: *Bymovirus*, barley yellow mosaic virus (RNA 1), BaYMV, NC\_002990; *Bymovirus*, barley mild mottle virus (RNA 1), BaMMV, NC\_003483; *Bymovirus*, oat mosaic virus (RNA 1), OMV, NC\_004016; *Macluravirus*, chinese yam necrotic mosaic virus, ChYNMV, NC\_018455; *Macluravirus*, artichoke latent virus, ArLV, NC\_026759; *Macluravirus*, yam chlorotic necrotic mosaic virus, NC\_038561; *Bevemovirus*, bellflower veinal mottle virus, BVMoV, NC\_039002; *Arepavirus*, areca palm necrotic spindle-spot virus, ANSSV, NC\_040836; *Celavirus*, celery latent virus, CeLV, NC\_055507; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 1, StyMaV-1, MK965971; ‘*Stylomovirus*’, stylo mosaic-associated virus 2, StyMaV-2, MK965972; *Brambyvirus*, blackberry virus Y, BVY, NC\_008558; *Potyvirus*, potato virus Y, PVY, NC\_001616; *Potyvirus*, soybean mosaic virus, SMV, NC\_002634; *Potyvirus*, bean common mosaic virus, BCMV, NC\_003397; *Rymovirus*, agropyron mosaic virus, AgMV, NC\_005903; *Rymovirus*, hordeum mosaic virus, HorMV, NC\_005904; *Rymovirus*, ryegrass mosaic virus, RgMV, NC\_001814; Unassigned, reed chlorotic stripe virus, CRCSV, NC\_035461; Unassigned, spartina mottle virus, SpMV, MN788417; *Roymovirus*, rose yellow mosaic virus, RoYMV, NC\_019031; *Roymovirus*, passiflora edulis symptomless virus, PeSV, NC\_055497; *Ipomovirus*, squash vein yellowing virus, SqVYV, NC\_010521; *Ipomovirus*, cassava brown streak virus, CBSV, NC\_012698; *Ipomovirus*, sweet potato mild mottle virus, SPMMV, NC\_003797; *Poacevirus*, triticum mosaic virus, TriMV, NC\_012799; *Poacevirus*, sugarcane streak mosaic virus, SCSMV, NC\_014037; *Poacevirus*, Caladenia virus A, CalVA, NC\_018572; *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, WSMV, NC\_001886; *Tritimovirus*, wheat eclid mosaic virus, WEqMV, NC\_009805; *Tritimovirus*, brome streak mosaic virus, BSMV, NC\_003501; Unassigned, Logan witches broom-associated virus, LWBaV, NC\_034835.

## REFERENCES

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae* (2005a). *Molecular Plant Pathology*. 6: 471–487p. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00296.x>

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae* (2005b). *Archives of Virology*. 150: 459–479p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0440-6>

AERLE, van R. and SANTOS, E. M. Advances in the application of high-throughput sequencing in invertebrate virology (2017). *Journal of Invertebrate Pathology*, 147: 145-156p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.02.006>

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMANN, D. J. Basic local alignment search tool (1990). *Journal Molecular Biology* 215: 403–410p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L.; SALES, M. F. L. Estilosantes Campo Grande: Leguminosa Forrageira Recomendada para Solos Arenosos do Acre (2010). Circular técnica (55), 1–12. Embrapa 1. In: [http://iquiri.cpfafac.embrapa.br/pdf/circtec\\_55\\_02022011\\_br.pdf](http://iquiri.cpfafac.embrapa.br/pdf/circtec_55_02022011_br.pdf)

BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology (2014). *Viruses* 6: 106–136p. DOI: <https://doi.org/10.3390/v6010106>

BLAWID, R.; SILVA, J. M. F.; NAGATA, T. Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline (2017). *Annals, Applied Biology*, 170 (3): 301-314p. DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12345>

CHEN, J.; SHI, N.; CHWNG, Y.; DIAO, A.; CHEN, J.; WILSON, T. M. A.; ANTONIW, J. F.; ADAMS, M. J. Molecular analysis of barley yellow mosaic virus isolates from China (1999). *Virus Research*, 64(1): 13-21p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00076-3)

de SOUZA, J. M.; FRAGOSO, K. N. S.; ORÍLIO, A. F.; MELO, F. L.; NAGATA, T.; FERNANDES, C. D.; VALÉRIO, J. R.; TORRES, F. Z. V.; AMARAL, B. B.; PEREIRA, T. B. C.; OLIVEIRA, A. S.; RESENDE, R. O. Two viroses from *Stylosanthes guianensis* may represent a new genus within *Potyviridae* (2021). *Virus Research*, 293: 198257, 1-12p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198257>

DOMBROVSKY, A.; REINGOLD, V.; ANTIGUNUS, Y. *Ipomovirus*: an atypical genus in the Family *Potyviridae* transmitted by whiteflies (2014). *Pest Manag Sci*, 70: 1552-1567p. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3735>

FELLERS, J. P.; SEIFERS, D.; RYB-WHITE, M.; MARTIN, T. J. The complete genome sequence of *Triticum mosaic virus*, a new wheat-infecting virus of the High Plains (2009). *Archives of Virology*, 154:1511-1515p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0462-1>

GONG, Y. N.; TANG, R. Q.; ZHANG, Y.; PENG, J.; XIAN, O. Y.; ZHANG, Z. H.; ZHANG, S. B.; ZHANG, D. Y.; LIU, H.; LUO, X. W.; LIU, Y. The NIa-Protease protein encoded by the *Pepper mottle virus* is a pathogenicity determinant and releases DNA methylation of *Nicotiana benthamiana* (2020). *Frontiers in Microbiology*, 11(102): 1-19p. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00102>

HOWELL, W. E.; THOMPSON, D.; SCOTT, S. Virus-like disorders of fruit trees with undetermined etiology (2011). Chapter 48 in: *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. DOI: <https://doi.org/10.1094/9780890545010.048>

JANK, L.; VALLE, C. B.; RESENDE, R. Brazilian society of plant breeding. Printed in Brazil breeding tropical forages Breed Tropical Forages Crop Breed (2011). *Appl. Biotechnol.* 1: 27–34p.

JOVER-GIL, S.; BEERI, A.; FRESMILLO, P.; SSMACH, A.; CANDELA, H. Complete genome sequence of a novel virus, classifiable within the *Potyviridae* family, which infects passion fruit (*Passiflora edulis*) (2018). *Archives of Virology*, 163(11): 3191-3194p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3983-7>

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvement's in performance and usability (2013). *Molecular Biology Evolution*, 30:772-780p. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

KONDO, T. & FUJITA, T. Complete nucleotide sequence and construction of an infectious clone of Chinese yam necrotic mosaic virus suggest that *Macluravirus* have the smallest genome among members of the family *Potyviridae* (2012). *Archives of virology*, 157: 2299-2307p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1429-1>

LAMOUNIER, T. A. da C.; de OLIVEIRA, L. M.; de CAMARGO, B. R.; RODRIGUES, K. B.; NORONHA, E. F.; RIBEIRO, B. M.; NAGATA, T. Production of Brazilian human norovirus VLPs and comparison of purification methods (2015). *Braz. J. Microbiol.* 46: 1265–1268p. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140925>

MARTIN, D.P.; MURRELL, B.; GOLDEN, M.; KHOOSAL, A.; MUHIRE, B. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes (2015). *Virus Evolution*, 1: vev003. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>

MARTÍNEZ, F.; RODRIGO, G.; ARAGONÉS, V.; RUIZ, M.; LODEWIJK, I.; FERNANDÉZ, U.; ELENA, S. F.; DARÓS, J. A. Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection (2016). *BMC Genomics* 17 (87): 1–13p. DOI: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2394-y>

MERTEN, G. H. & MINELLA, J. P. G. The expansion of Brazilian agriculture: soil erosion scenarios (2013). *Int. Soil Water Conserv. Res.* 1 (3): 37–48p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-6339\(15\)30029-0](https://doi.org/10.1016/S2095-6339(15)30029-0)

MOLLOV, D.; LOCKHART, B.; ZLESK, D. Complete nucleotide sequence of rose yellow mosaic virus, a novel member of the family *Potyviridae* (2013). *Archives of Virology*, 158: 1917-1923p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1686-7>

MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation (2014). *PLoS ONE*. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>

OLIVEIRA, L. M.; ORILIO, A. F.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T.; BLAWID, R. A novel vitivirus-like sequence found in *Arracacia xanthorrhiza* plants by high throughput sequencing (2017). *Archives of Virology*, 162(7): 2141-2214p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3326-0>

OLSPERT, A.; CHUNG, B. Y.; ATKINS, J. F.; CARR, J. P.; FIRTH, A. E. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyviridae* (2015). *EMBO Rep.* 16: 995–1004p. DOI: <https://doi.org/10.15252/embr.201540509>

REVERS, F. & GARCIA, J. A. Molecular biology of potyviruses (2015). *Advances in virus research*, 92(3): 101-199p. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>

ROBAGLIA, C.; DURAND-TARDIF, M.; TRONCHET, M.; BOUDAZIN, G.; ASTIER-MANIFACIER, S.; CASSE-DELBART, F. Nucleotide sequence of *Potato virus Y* (N strain) genomic RNA (1989). *Journal General of Virology*, 70: 935-947p. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-4-935>

RODAMILANS, B.; VALLI, A.; MINGOT, A.; LÉON, D. S.; BAULCOMBE, D.; LÓPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the *Potyviridae* family (2015). *Journal of Virology*, 89(13): 6965-6967p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00337-15>

ROHOZKOVÁ, J., NAVRÁTIL, M. P1 peptidase – a mysterious protein of family *Potyviridae* (2011). *Journal of Biosciences* 36: 189-200p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9020-6>

ROSE, H.; DORIN, I.; VETTEN, H. J.; MONZEL, W.; RICHERT-POGGELER, K. R.; MAISS, E. Complete genome sequence and construction of a infectious full-length cDNA clone of celery latent virus- an unusual member of a putative new genus within the *Potyviridae* (2019). *Journal of General Virology*, 100, 308-320p. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001207>

SALLÉS, F. J. and STICKLAND, S. Rapid and sensitive analysis of mRNA polyadenylation states by PCR (1995). *Genome Research*, 4(6): 317-321p. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.4.6.317>

SCHUBERT, J.; FAUQUET, C.; MERITS, A.; RABENSTEIN, F. The complete nucleotide sequence of the Ryegrass mosaic potyvirus indicates that it is a recombinant between members of two different genera in the family *Potyviridae* (1999). *Journal of Plant Disease and Protection*, 106(4): 392-404p. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-8-2035>

SEO, J. K.; KWAK, H. R.; KIM, M. K.; KIM, J. S.; CHOI, H. S. The complete genome sequence of a novel virus, bellflower veinal mottle virus, suggests the existence of a new genus within the family *Potyviridae* (2017). *Archives of Virology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3374-5>

SILVA, K. N.; NICOLINI, C.; SILVA, M. S.; FERNANDES, C. D.; NAGATA, T.; RESENDE, R. O. First report of johnsongrass mosaic virus (JGMV) infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil (2013). *Plant Disease*, 97: 1003p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0013-PDN>

STENGER, D. C.; HALL, J. S.; CHOI, I-R.; FRENCH, R. Phylogenetic relationship within the Family *Potyviridae*: *Wheat streak mosaic virus* and *Brome streak mosaic virus* are not members of the genus *Rymovirus* (1998). *Phytopathology*, 88(8): 782-787p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.8.782>

SUSAIMUTHU, J.; TZANETAKIS, I. E.; GERGERICH, R. C.; MARTIN, R. R. A member of a new genus in the *Potyviridae* infects *Rubus* (2008). *Virus Research*, 131: 143-151p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.09.001>

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. *Potyvirus* protein: a wealth function (2001). *Virus Research*, 74: 157-175 p. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1701\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1701(01)00220-9)

VALLI, A. A.; GALLO, A.; RODAMILANS, B.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. The HC-Pro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking helper component that every virus would like to have (2018). *Molecular Plant Pathology*, 19(3): 744-763p. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12553>

YANG, K.; RAN, M.; LI, Z.; HU, M.; ZHENG, L.; LIU, W.; JIN, P.; MIAO, W.; ZHON, P.; SHEN, W.; CUI, H. Analysis of the complete genome sequence of a novel virus, areca palm necrotic spindle-spot virus, reveals the existence of a new genus in the Family *Potyviridae* (2018). *Archives of Virology*, 163: 3471-3475p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3980-x>

WYLIE, S. J., ADAMS, M., CHALAM, C., KREUZE, J., LOPEZ-MOYA, J. J., OHSHIMA, K., PRAVEEN, S., RABENSTEIN, F., STENGER, D., WANG, A.; ZERBINI, F. M. ICTV virus taxonomy profile: *Potyviridae* (2017). *Journal General Virology*, 98: 352–354p. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740>

WHITFIELD, A. E.; FALK, B. W.; ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses (2015). *Virology*, 479–480p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>

## CAPÍTULO 4:

### ENSAIOS DE TRANSMISSÃO DOS STYLOVIRUSES COM MOSCA BRANCA E CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS VIRAIS

#### RESUMO

*Stylosanthes guianensis* é uma leguminosa forrageira que faz parte da família Fabaceae, juntamente com outras leguminosas de importância econômica como soja e feijão. Tem sido usado com muito sucesso na recuperação de pastagens degradadas, como fonte de proteína, devido ao seu alto valor nutricional e em consórcio com gramíneas forrageiras. Nos últimos anos, sintomas de mosaico, típicos de espécies da família *Potyviridae* têm sido observados em plantas de estíloantes em áreas de pastagens do Brasil. Sendo assim, amostras sintomáticas foram coletadas dos campos experimentais da Embrapa Gado de Corte- MS e sequenciadas pela Plataforma Illumina HiSeq. A partir desse sequenciamento, três novos membros da família *Potyviridae* foram descobertos com base na análise da sequência consenso e no critério de demarcação de espécie dentro da família. Além disso, duas dessas espécies compõem um potencial novo gênero, denominado tentativamente *Stylovirus*, já a outra espécie nova, agrupa-se em um gênero existente, o *Roymovirus*. Essa nova proposta taxonômica foi visualizada nas árvores filogenéticas e agrupamentos virais provenientes dessas análises que foram geradas a partir das sequências genômicas da poliproteína e do genoma completo (aminoácidos e nucleotídeos). Sendo assim, esses resultados trouxeram a primeira caracterização de vírus de estíloantes, “styloviruses”, no Brasil e no mundo, nomeados provisoriamente de “Stylo mosaic-associated virus 1”, “Stylo mosaic-associated virus 2” e “Stylo yellow mosaic virus”. Nesses mesmos campos experimentais, onde sintomas tipicamente virais foram observados, notou-se a presença de mosca branca trazendo a suspeita de esse ser um potencial vetor. Ensaio de transmissão com mosca branca foram realizados e foi confirmado a transmissão dos vírus de estíloantes por esse vetor. Além disso, visando o desenvolvimento de ferramentas de detecção viral, foram construídos vetores para expressão heteróloga com o intuito de produzir antissoro policlonal a partir da proteína do capsídeo viral.

**Palavras-chave:** Fabaceae, *Potyviridae*, Plataforma Illumina, styloviruses, MEAM 1

## ABSTRACT

*Stylosanthes guianensis* is a forage legume that is part of the Fabaceae family, along with other economically important legume such as soybeans and beans. It has been used with great success in the recovery of degraded pastures, as a protein source, due to its high nutritional value and in intercropping with forage grasses. In recent years, mosaic symptoms, typical of species of the *Potyviridae* family, have been observed in stylish plants in Brazilian pastures. Thus, symptomatic samples were collected from the experimental fields of Embrapa Beef Cattle-MS and sequenced by the Illumina HiSeq Platform. From this sequencing, three new members of the *Potyviridae* family were discovered based on the consensus sequence analysis and the species demarcation criteria within the family. In addition, two of these species make up a potential new genus, tentatively called *Stylomovirus*, while the other new species is grouped into an existing genus, *Roymovirus*. This new taxonomic proposal was visualized in phylogenetic trees and viral groupings from these analyzes that were generated from the genomic sequences of the polyprotein and full genome (amino acids and nucleotides). Thus, these results brought the first characterization of the stylo virus, "styloviruses", in Brazil and in the world, provisionally named "Stylo mosaic-associated virus 1", "Stylo mosaic-associated virus 2" and "Stylo yellow mosaic virus". In these same experimental fields, where typically viral symptoms were observed, the presence of whitefly was noted, placed this insect as being a potential vector. Transmission assays with whitefly were carried out and the transmission of stylo viruses by this vector was confirmed. In addition, aiming the production of virus detection tools, expression vectors for heterologous expression of virus proteins were constructed to produce polyclonal antiserum from the capsid protein.

**Keywords:** Fabaceae, *Potyviridae*, Illumina Plataform, styloviruses, MEAM 1

## 4.1 INTRODUÇÃO

Três vírus em estilosantes da espécie *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão, foram detectados por sequenciamento via *High-throughput sequencing* (HTS) como já mencionado nos manuscritos presentes nos capítulos 2 e 3, constituindo assim, três novos membros pertencentes a família *Potyviridae*, os styloviruses. Análises filogenéticas mostraram que os vírus Stylo mosaic-associated virus 1 (StyMaV-1) e Stylo mosaic-associated virus 2 (StyMaV-2), além de serem novas espécies dentro da família, pertencem a um novo gênero proposto, o *Stylomovirus*. Já o terceiro vírus denominado Stylo yellow mosaic virus (StyYMV), representa uma nova espécie que pertence a um gênero já existente, o *Roymovirus*.

A família *Potyviridae* é uma das maiores que afetam plantas monocotiledôneas, dicotiledônias, ornamentais e grandes culturas de interesse econômico. Possui 235 espécies já descritas distribuídas em 12 gêneros aceitos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2021). Como critério de classificação para novo gênero, a organização genômica, a gama de hospedeira e o inseto vetor, são fatores considerados importantes, já que diferentes gêneros podem ser transmitidos por diferentes insetos e até mesmo por oomiceto (Wylie *et al.*, 2017). Como critério para nova espécie a sequência de nucleotídeo (nt) e aminoácido (aa) da capa proteica (CP) é então usada (Adams *et al.*, 2005)

As moscas brancas (*Bemisia tabaci*- Hemiptera: Aleyrodidae) são insetos polívoros e considerados pragas de suma importância na agricultura, pois causam não só danos às culturas devido a sua alimentação, mas também por transmitirem diversas espécies de gêneros virais como: *Ipomovirus*, *Carlavirus*, *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Torradovirus* e *Polerovirus* (Navas-Castillo *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2020). São insetos considerados super vetores de vírus, denominados assim, devido sua alta capacidade de reprodução, dispersão, colonização em diferentes hospedeiras e serem pouco suscetíveis a inseticidas (Gilbertson *et al.*, 2015; Kanakala & Ghanim, 2015).

Nos anos 70, a espécie predominante de *Bemisia tabaci* no Brasil era o biótipo A e as epidemias não eram tão comuns (Marubayashi *et al.*, 2013). Com a detecção do Middle East-Asia Minor 1-MEAM1 (anteriormente Biótipo B), após esse período, ocorreu um aumento de viroses infectando diferentes culturas (Navas-Castillo *et al.*, 2011). Atualmente no Brasil, essa é a espécie predominante, sendo uma das responsáveis por grandes perdas em campo (Marubayashi *et al.*, 2013). A correta identificação dos vetores envolvidos no processo de transmissão é importante e possibilita o manejo adequado da cultura no campo, o controle desses insetos e métodos preventivos de viroses (Petersen *et al.*, 2019).

As altas taxas de disseminação desses vírus ocorrem provavelmente por conta dessa disseminação e conseqüentemente a ativa migração desses vetores, como também o tipo de inter-relação existente entre vetor-vírus-planta (Oliveira *et al.*, 2019). Esses fatores dificultam o controle e a prevenção de infecções causadas por esses vírus na agricultura. Por isso é necessário realizar trabalhos de transmissão com potenciais vetores e conhecer o tipo de relação existente para propor métodos efetivos de controle (Ivanov *et al.*, 2014). Uma vez que a infecção ocorre, é preciso detectar e caracterizar essas espécies virais. Sendo assim, diversas ferramentas moleculares são utilizadas com essa finalidade (Jeong *et al.*, 2014).

A proteína capsial dos vírus (CP) é comumente usada para a produção de antissoros policlonais. Os antissoros são utilizados na sorologia para a identificação e classificação de novas estirpes e espécies virais, como também, em estudos de interação entre proteínas virais e do hospedeiro (Basso *et al.*, 2010; Ala-Poikela *et al.*, 2011). Essa proteína pode ser obtida a partir de um processo de purificação viral ou simplesmente, via amplificação do gene que codifica a proteína da CP para posterior expressão heteróloga em um sistema que pode ocorrer em diferentes organismos como: plantas, insetos, mamíferos, bactérias e leveduras (Sørensen, 2010).

O uso dos sistemas de expressão para a produção de proteínas heterólogas têm crescido de forma comercial, pois além de serem sistemas eficientes e que possuem baixo custo, são fáceis de manipular e purificar as proteínas produzidas (Brown, 2010). O sistema de expressão com *Escherichia coli* é um dos mais utilizados na engenharia genética e na produção de proteínas heterólogas, pois cresce em meio de cultivo de baixo custo, fornece altos níveis de expressão de proteínas, possui um acúmulo rápido de biomassa e permite um processo de escalonamento simplificado (Walsh, 2010).

Entretanto, esse sistema tem algumas limitações, tais como: não realiza modificações pós-traducionais, não há um sistema de secreção da proteína em meio de cultura, além da formação de agregados insolúveis mais conhecidos como corpos de inclusão, que podem dificultar o dobramento normal da proteína, tornando-a inativa (Berkmen, 2012). Outro sistema de expressão que tem crescido e ganhado cada vez mais espaço é com a levedura metilotrófica *Komagataella phaffii*, anteriormente chamada de *Pichia pastoris*. Essa levedura é capaz de utilizar o metanol como única fonte de carbono (Küberl *et al.*, 2011).

Uma grande vantagem que ela possui com relação a outros sistemas é de secretar poucas proteínas endógenas. Sua capacidade de direcionar a proteína para a via secretória funciona como uma “pré-purificação”, permitindo que a maior parte da fração proteica fique no

sobrenadante. Há outras vantagens também como: modificações pós-traducionais eficientes, maior produtividade e baixo custo (Kariner *et al.*, 2012). No contexto deste trabalho, a produção de antissoros para ser utilizado como detecção em larga escala para os vírus de estilosantes poderá ser muito útil para a seleção de genótipos resistentes para o Programa de Melhoramento Genético dessa forrageira na Embrapa Gado de Corte- MS.

Esses vírus foram detectados co-infectando estilosantes em campos experimentais de diferentes estados do Brasil na região Centro-Oeste, como Mato Grosso do Sul, Brasília e Bahia, onde havia uma alta incidência de moscas brancas. Essas plantas do campo apresentavam sintomas tipicamente virais que variavam entre mosaico moderado a um mosaico amarelo e pontos cloróticos. Dadas essas circunstâncias, e a presença constante de moscas brancas nos campos experimentais, foi realizado um ensaio de transmissão com a espécie MEAM 1. Além disso, com a finalidade de produzir antissoros policlonais para detecção viral, vetores para expressão heteróloga de proteínas foram construídos utilizando-se a proteína do capsídeo (CP) dos três vírus de estilosantes caracterizados (StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV).

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

A origem das amostras de estilosantes Mineirão (GC 22 e GC 23) coletadas para sequenciamento via HTS é do campo experimental da Embrapa Gado de Corte (CNPGC) de Campo Grande- MS. As coletas foram realizadas em março de 2013 e desde então, as amostras permanecem armazenadas a -80°C, no laboratório de virologia vegetal do departamento de Biologia Celular da UnB. Os ensaios de transmissão foram feitos com mosca branca e conduzidos em campo experimental e casa de vegetação da Embrapa Gado de Corte e na Estação Experimental Biológica da UnB.

### **4.2.1 Ensaio de transmissão com mosca branca na Embrapa CNPGC**

Um ensaio preliminar foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Gado de Corte. Primeiramente, os insetos foram coletados do campo experimental em amostras sintomáticas de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (figura 4.1). A partir das plantas que apresentavam sintomas de mosaico intenso, típico de vírus, folhas foram coletadas e submetidas a técnica de RT-PCR para detecção dos styloviruses. Em casa de vegetação, plantas de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão provenientes de sementes foram mantidas em vasos de 1L por 15 dias após a germinação.



**Figura 4.1:** Sintomas virais em amostras de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão. Sintomas de mosaico intenso foram observados no acesso GC 984 do campo experimental da Embrapa Gado de Corte- MS (Mato Grosso do Sul) em que as moscas brancas foram coletadas para o ensaio de transmissão.

Os vasos, que continham uma planta em cada, foram individualmente protegidos por telas anti-mosca (figura 4.2) e antes da exposição às moscas brancas, folhas assintomáticas foram coletadas para realização da detecção dos styloviruses e certificação de que essas plantas não continham vírus. As moscas brancas foram coletadas das amostras sintomáticas de campo com o auxílio de um sugador e conduzidas para a casa de vegetação onde foram colocadas nas plantas livres de vírus.

Utilizou-se um total de vinte plantas de estilosantes sendo colocadas cinco moscas para se alimentar em cada planta, permanecendo assim por 7 dias. Após 15 dias de exposição aos insetos potencialmente virulíferos, os primeiros sintomas foram observados e os trifólios sintomáticos foram coletados para extração de RNA total conforme o protocolo Plant RNA (anexo I-1).



**Figura 4.2:** Plantas de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão mantidas em casa de vegetação da Embrapa Gado de Corte-MS em vasos de 1L protegidas por tela anti-mosca.

As amostras sintomáticas foram coletadas e submetidas à detecção dos styloviruses por RT-PCR usando sequências de iniciadores específicos para amplificar as regiões das proteínas da CP e parte da NIB, como descrito na tabela 4.1. Para fazer a RT, foi usada a enzima M-MLV

(Invitrogen) e o oligonucleotídeo dT50M10 que possui uma sequência âncora juntamente com uma cauda Poly-T (5' AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA T<sub>50</sub> 3') de acordo com as recomendações do fabricante (anexo I-2).

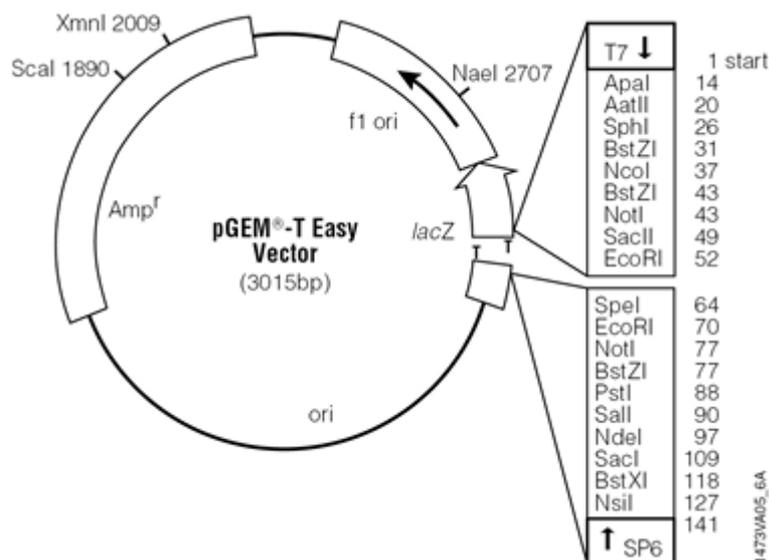
Em seguida, a PCR foi feita usando a enzima *Platinum Taq Polymerase DNA* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante (anexo I-3). Como oligonucleotídeo antisense foi usado o M10 que possui uma sequência alvo (5' AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA 3') que reconhece a sequência âncora do iniciador dT50M10 usado para a RT e os oligonucleotídeos senso foram sequências específicas de cada um dos stylovirus como descritos na tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Iniciadores sintetizados para amplificação parte da proteína N1b e a proteína CP completa dos “stylovirus”.

Acrônimo	Sequência de iniciadores	Tm(c)
StyMaV-1_F	5' TGGAACAACCTGCAATATGAGCATG 3'	59,4°
StyMaV-2_F	5' ATGAACTGCGAGAGTTCCTC 3'	58,4°
StyYMV_F	5' GAGCCAACGTACCATACAGA 3'	58,4°

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (AMRESCO) 1% com tampão de corrida TBE 0,5x (45 mM de Tris-borato; 1 mM de EDTA), corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e analisados em um fotodocumentador sob luz ultravioleta no programa *GeneSyn* que possibilita a visualização dos fragmentos de DNA separados por eletroforese.

Posteriormente, o produto de PCR foi eluído (anexo I-4), ligado no vetor pGEM-T Easy (figura 4.3) (anexo I-5) e transformado (anexo I-6) em células competentes de *E. coli* DH10β (anexo I-7) de acordo com as recomendações do fabricante e o protocolo desenvolvido por Sambrook & Russel (2000). Em seguida, os DNAs recombinantes foram submetidos ao sequenciamento via Sanger para a confirmação dos vírus transmitidos pelas moscas brancas.



**Figura 4.3:** Representação esquemática do mapa do vetor pGEM T Easy *Promega*. Na figura é possível ver os múltiplos sítios de restrição de enzimas, a marca de seleção pelo antibiótico Ampicilina e o tamanho do vetor que possui 3015pb. Disponível em: <https://www.promega.com.br/en/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/>

#### 4.2.2 Inoculação mecânica em *Stylosanthes guianensis* cvs. Mineirão e Bela

A inoculação mecânica em plantas dessas cultivares foi feita usando como inóculo as amostras de estilosantes (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão GC 22 e GC 23) enviadas para sequenciamento via HTS, contendo os isolados Stylo mosaic-associated virus 1 (StyMaV-1), Stylo mosaic-associated virus 2 (StyMaV-2) e Stylo yellow mosaic virus (StyYMV). Foram usadas um total de 64 plantas para o ensaio de inoculação mecânica, 40 foram inoculadas e 24 não inoculadas para serem usadas como controles negativos.

As folhas de estilosantes infectadas por esses vírus foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), adicionado de sulfito de sódio a 0,01 M (NaSO<sub>3</sub>) e PVP 40. Após isso, o extrato vegetal foi inoculado mecanicamente em 20 plantas de estilosantes da cultivar Mineirão e 20 da cultivar Bela (figura 4.4). As plantas foram polvilhadas com carborundum 600 mesh antes da inoculação mecânica e lavadas com água corrente imediatamente após a inoculação.



**Figura 4.4:** Plantas de *Stylosanthes guianensis* cvs. Mineirão (M) e Bela (B) inoculadas mecanicamente, com extrato vegetal das amostras GC 22 e GC 23 contendo os vírus StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV, após 15 dias de semeadura.

Depois do processo de inoculação mecânica, as plantas permaneceram em casa-de-vegetação para evolução dos sintomas, por 45 dias e as infecções virais foram verificadas por RT-PCR conforme os protocolos descritos no anexo I-2 e anexo I-3, usando sequências de oligonucleotídeos específicos (tabela 4.1) para identificação styloviruses. Sintomas como mosaico moderado e mosaico amarelo foram observados. Algumas plantas morreram após o processo de inoculação.

#### 4.2.3 Ensaio de transmissão com mosca branca na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (EEB- UnB)

Aproveitando as plantas sintomáticas provenientes da inoculação mecânica, um segundo ensaio com mosca branca foi então conduzido em casa de vegetação na Estação Experimental da UnB (EEB-UnB). Foram usadas moscas brancas avirulíferas provenientes da criação de MEAM 1 em folhas de repolho protegidas em ambiente de casa de vegetação (figura 4.5). Em casa de vegetação, plantas de *Stylosanthes guianensis* cvs. Mineirão e Bela provenientes de sementes foram mantidas em vasos de 1L por 15 dias após a germinação, depois, foram inoculadas mecanicamente.



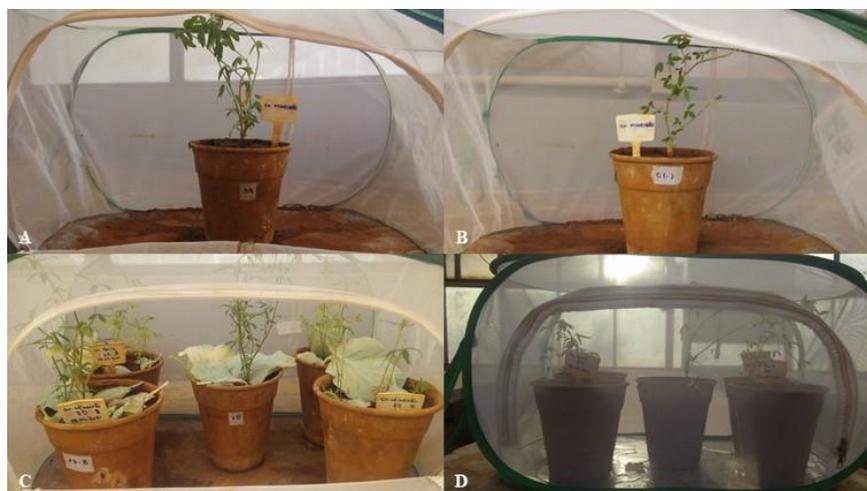
**Figura 4.5:** A) Criação de moscas brancas em plantas de repolho da casa de vegetação na Estação Experimental de Biologia da UnB. B) Middle East-Asia Minor 1 (MEAM 1) em diferentes instares colonizando folhas de repolho.

Foram selecionadas 5 plantas sintomáticas onde 1 era a cultivar Bela com o vírus StyMaV-2 denominada de isolado 2D, e outras 4 plantas da cultivar Mineirão contendo apenas o vírus StyYMV, denominadas 3A, 3C, 8A e 8C. Um total de 20 plantas, 10 plantas da cultivar Mineirão e 10 da cultivar Bela, que não foram inoculadas mecanicamente e que estavam assintomáticas, foram usadas no ensaio como controle negativo. Os isolados 2D, 3A, 3C, 8A e

8C foram colocados, individualmente, em gaiolas do tipo “clip cage” protegidas por tela anti-mosca (figura 4.6-A).

Da mesma forma foi feito com os controles negativos, em que foram usadas 3 plantas da cultivar Mineirão, assintomáticas, não infectadas por esses vírus e previamente testadas via RT-PCR (anexo I-2 e anexo I-3) para os stylovirus (StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV), permanecendo cada planta em uma gaiola individual (figura 4.6-B). Em seguida, foram cortadas folhas de repolho contendo moscas brancas em diferentes instares de desenvolvimento como mostrado na figura 4.5-B do item 4.2.3 e colocadas nas plantas dentro das gaiolas em contato com os isolados (plantas sintomáticas), e nas gaiolas com os controles negativos.

A quantidade de moscas colocada em cada planta na gaiola não foi estimada, porém, foram retiradas as folhas de cinco plantas de repolho infestadas por moscas. As moscas foram mantidas por 10 dias para que houvesse não só um período de acesso à aquisição (PAA) adequado, como também, para que as moscas se desenvolvessem e atingissem novos instares. Após isso, em cada gaiola foram inseridas duas plantas da cultivar Mineirão e duas plantas da cultivar Bela (figura 4.6-C), assintomáticas e previamente testadas via RT-PCR (anexo I-2 e anexo I-3) para os styloviruses.



**Figura 4.6:** A) Isolado 3A de estilosantes cv. Mineirão colocado em gaiola individual tipo “clip cage”. O mesmo foi feito com os demais isolados (2D, 3C, 8A e 8C). B) Uma das três plantas usadas como controle de estilosantes cv. Mineirão colocada em gaiola individual assim como foi feito com os isolados em “A”. C) Plantas de estilosantes cvs. Mineirão e Bela inseridas nas gaiolas contendo moscas após o processo de aquisição para posterior transmissão. D) Plantas com moscas mantidas nas gaiolas durante o ensaio de transmissão que durou 45 dias.

As plantas permaneceram nas gaiolas por um período total de 45 dias (figura 4.6-D) e, os primeiros sintomas foram observados após 15 dias de exposição aos insetos potencialmente virulíferos. Sintomas de mosaico intenso foram observados nas plantas que ficaram expostas aos insetos, que anteriormente passaram pelo processo de aquisição no isolado 2D.

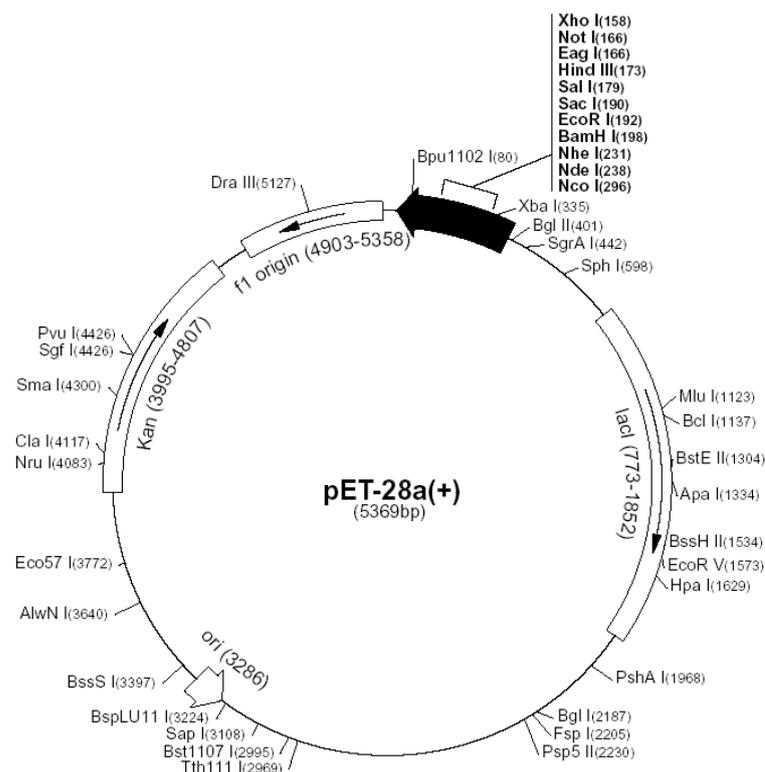
Já um mosaico amarelo, foi observado nas plantas expostas aos insetos, que anteriormente passaram pelo processo de aquisição nos isolados 3A, 3C, 8A e 8C. Os trifólios sintomáticos foram coletados para extração de RNA total (anexo I-1) seguida pela detecção via RT-PCR (anexo I-2 e anexo I-3) para confirmar a presença dos vírus, assim como, os trifólios dos controles negativos.

#### **4.2.4 Produção de antissoro policlonal a partir do gene da capa proteica (CP) dos “styloviruses”**

Dois sistemas de expressão heteróloga foram usados como tentativa de obter as proteínas da CP dos styloviruses purificadas para a produção de antissoro policlonal. O primeiro foi o sistema de expressão em bactéria usando o organismo *E. coli*, e posteriormente foi usado o sistema de expressão em levedura usando o organismo *K. phaffi*. Os isolados usados são oriundos das amostras de estilosantes cv. Mineirão (GC 22 e GC 23) coletadas em campo experimental da Embrapa Gado de Corte- MS e que permanecem armazenadas a -80°C.

#### **4.2.5 Construção de vetores para expressão heteróloga em *E. coli* SHuttle a partir do gene da CP dos “styloviruses” para produção de antissoro policlonal**

O sistema de expressão em *E. coli* foi escolhido inicialmente por ser organismo geneticamente e fisiologicamente bem estudado, possuir uma diversidade de vetores de clonagem, possuir um fácil controle da expressão gênica e fácil crescimento e secreção em meio de cultura. O vetor pET28a (Novagene) possui o promotor T7 (Figura 4.7), sítios de múltipla clonagem para diferentes enzimas de restrição e uma sequência His-Tag que garante uma purificação mais fácil de proteínas recombinantes a partir de cromatografia por afinidade, já que essa sequência é capaz de se ligar a resinas de quelação de metais.



**Figura 4.7:** Representação esquemática do mapa do vetor pET 28a *Novogene*. Na figura é possível ver os múltiplos sítios de restrição de enzimas, da marca de seleção pelo antibiótico canamicina e o tamanho do vetor que possui 5369pb. Disponível em: <https://pt.scribd.com/doc/91910066/pET-28a-c>

Portanto, as sequências de DNA que codificam cada uma dessas proteínas foram amplificadas usando sequências de oligonucleotídeos específicos para os genes da capa proteica (CP) desses vírus (tabela 4.2). Foi feita RT usando SSIV (anexo I-8) e PCR usando enzima LongAmp (anexo I-9). Os sítios de restrição *BamHI* (GGATCC), *XhoI* (CTCGAG) e *EcoRI* (GAATTC) foram inseridos nos genes da CP de cada um dos três vírus: Stylo mosaic-associated virus 1 (StyMaV-1), Stylo mosaic-associated virus 2 (StyMaV-2) e Stylo yellow mosac virus (StyYMV), como mostra a tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Iniciadores sintetizados para amplificação dos genes da CP dos “styloviruses”.

Vírus	Sequência*	Orientação	Sítio de restrição
StyMaV-1	5' <u>GGATCC</u> GAATCACCATTACAGGGAGG3'	senso	<i>BamHI</i>
StyMaV-1	5' <u>CTCGAG</u> TTATATTGCTATATTAGTTCCC3'	antisenso	<i>XhoI</i>
StyMaV-2	5' <u>GGATCC</u> TCAGGATCAATTGAGGGTGG3'	senso	<i>BamHI</i>
StyMaV-2	5' <u>CTCGAG</u> TCATATGGTTATACTAGTTC3'	antisenso	<i>XhoI</i>
StyYMV	5' <u>GAATTC</u> GATCGAGGGCTACCAGTGCG3'	senso	<i>XhoI</i>
StyYMV	5' <u>CTCGAG</u> TTATCTGTAAAGACCTGCTTT3'	antisenso	<i>EcoRI</i>

\*Os seis primeiros nucleotídeos sublinhados correspondem à sequência dos sítios de restrição.

Os fragmentos amplificados foram ligados em vetor pGEM-T *Easy* (Promega) (anexo I-5), sendo posteriormente digeridos, com as devidas enzimas de restrição *BamHI* (Anza), *XhoI* (Anza) e *EcoRI* (Anza) utilizando-se o tampão Anza Red Buffer 10X de acordo com o protocolo de digestão dupla fornecido pelo aplicativo do fabricante (anexo I-10).

O vetor de expressão pET28a foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* utilizando-se o tampão Anza Red Buffer 10X, para posteriormente ligar os insertos dos vírus StyMaV-1 e StyMaV-2 e com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* utilizando-se o tampão NEB 3.1, também de acordo com o protocolo de digestão dupla fornecido pelo fabricante para a posterior ligação do vírus StyYMV (anexo I-10).

Todas as digestões ocorreram a 37 °C por 16 horas e os produtos gerados a partir disso foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (AMRESCO®) 1%, com tampão de corrida TBE 0,5x (45 mM de Tris-borato; 1 mM de EDTA), corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e analisados em um fotodocumentador sob luz ultravioleta no programa *GeneSyn* que possibilita a visualização dos fragmentos de DNA separados por eletroforese.

Por fim, os fragmentos com tamanho esperado foram extraídos do gel com lâmina de bisturi e purificados seguindo instruções do kit comercial GFX PCR DNA and *Gel Band Purification* (GE Healthcare) (anexo I-4). Os insertos e o vetor pET28a, previamente digeridos e purificados foram submetidos à reação de ligação, com a enzima T4 DNA ligase (Promega) permanecendo a 4°C por 16 horas, de acordo com as instruções do fabricante (anexo I-5).

Os produtos da ligação foram utilizados para a transformação e clonagem (anexo I-6) em células DH10β (Invitrogen) eletrocompetentes de acordo com o manual Sambrook & Russel (2000) e as colônias positivas foram selecionadas em meio LB (Luria-Bertani) seletivo com o antibiótico canamicina (50 µg/ml). Os vetores recombinantes (pET28a+CPs) foram isolados e purificados com o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) seguindo as instruções do fabricante (anexo I-11) e utilizados para a transformação e clonagem (anexo I-13) em células de expressão SHuttle T7® (C3026-NEB) quimiocompetentes (anexo I-12).

#### **4.2.6 Expressão e purificação das proteínas CPs dos “styloviruses”**

As colônias positivas selecionadas foram inoculadas em 10 ml de meio LB, incubadas durante 16 horas, a 37 °C, com o antibiótico canamicina (50 µg/ml) e submetidas à agitação de 180 RPM. Posteriormente, 5 ml do pré-inóculo foi utilizado para inocular 100 ml de meio LB disposto em um frasco de Erlenmeyer de 1 L. Os frascos seguiram sob agitação de 180 RPM,

a 37 °C por aproximadamente três horas até que a densidade óptica (OD) de 600 nm atingisse 0,4. A expressão das proteínas foi induzida por meio da adição de IPTG (isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosídeo) 0,5 mM e a temperatura foi abaixada até que o meio de cultura atingisse 25 °C.

Alíquotas de 5 ml do meio foram coletadas no momento da adição de IPTG ( $T_{0h}$ , tempo-zero), quatro horas após a indução ( $T_{4hs}$ ) e 16 horas após a indução. Após isso, as células foram coletadas em centrifugação a 4000 RPM por 10 minutos e ressuspensas em 10 ml de tampão fosfato de sódio 20 mM. As células foram sonicadas no aparelho *Bandelin Sonopuls* (Sigma) no gelo em 3 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos. Centrifugou-se a amostra por 30 minutos a 10000 RPM à 4 °C.

Uma alíquota (50  $\mu$ l) das frações celulares solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado) foi separada, fervida a 98 °C por 10 minutos com tampão de amostra Laemmli 5x (5  $\mu$ l) e submetidas ao SDS-PAGE. Para a análise das proteínas em gel de poliacrilamida, os géis foram preparados a partir da mistura de N, N'-metileno-bis-acrilamida 0,8% e acrilamida 30% (p/v). O gel de separação (12%) foi feito adicionando-se a esta mistura Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,01%. O gel foi polimerizado pela adição de persulfato de amônio a 10% em água destilada (0,5% v/v) e TEMED 0,05% (v/v). O gel de concentração (5% de acrilamida) foi preparado como descrito anteriormente para o gel de separação, porém utilizando-se tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (Laemmli, 1970).

As amostras de extratos proteicos foram ressuspensas em tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8; azul de Bromofenol 1%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5%; glicerol 10%), fervidas em banho-Maria por 5 minutos e aplicadas nos poços do gel de concentração. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida 1x (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH 8,3) em voltagem constante de 100 V. Após a corrida, os géis foram corados por 30 minutos em azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%) e descorados em solução descorante (etanol 30%; ácido acético 10%).

A purificação das proteínas CPs fusionadas à cauda de histidina foi inicialmente através de cromatografia por afinidade a níquel. O extrato foi injetado em coluna HisTrap HP de 1 ml (*GE Healthcare Life Sciences*) previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) de tampão A. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 5 vc de tampão A, ou até que nenhuma leitura de absorvância fosse observada a 280 nm.

A eluição foi feita em concentração crescente de imidazol utilizando 25 vc de tampão B (fosfato de Sódio 20 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 500 mM; pH 7,5) e amostras recolhidas ao

longo de todo o processo foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS usando a metodologia descrita acima. As propriedades das proteínas foram preditas *in silico* para a escolha dos tampões, do pH e das colunas de troca iônica (tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** Propriedades das proteínas CPs.

	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Peso Molecular* (kDa)	Ponto Isoelétrico* (PI)
CP- StyMaV-1	846	282	31,64	6,71
CP- StyMaV-2	846	282	31,68	6,54
CP- StyYMV	663	221	25,04	6,42

\*Valores computados por meio do programa *Compute pI/Mw*. Disponível em: [http://web.expasy.org/compute\\_pi](http://web.expasy.org/compute_pi)

#### 4.2.7 Análises dos transformantes de *E. coli* por Western Blotting

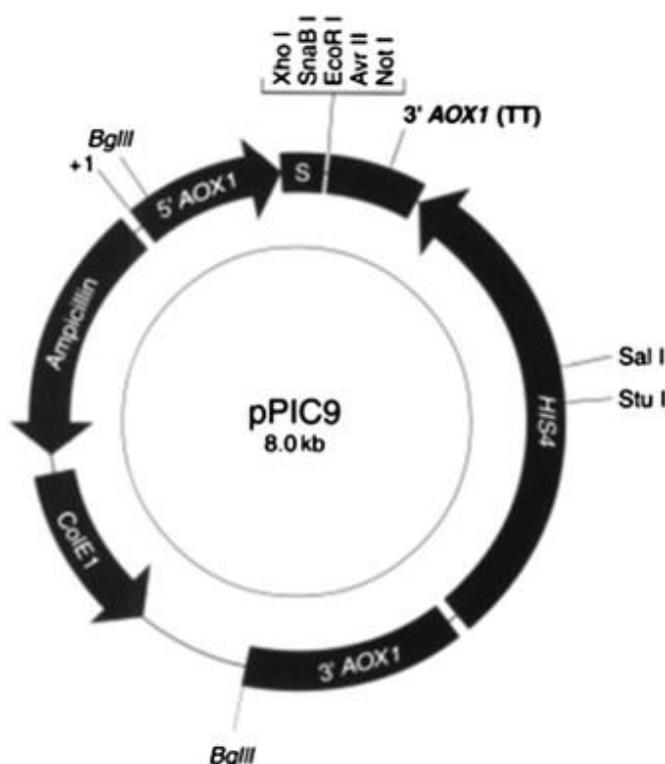
Após a corrida do gel de poliacrilamida, este foi transferido para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema de transferência semi-seco com eletrodos de grafite (Pharmacia-LKB®). Conforme instruções do fabricante fez-se um “sanduíche” com papéis filtro Watmann 3 mm previamente embebidos em tampão de transferência contendo a membrana de nitrocelulose unida ao gel e entre os papéis filtro.

O “sanduíche” foi colocado entre os eletrodos de grafite e submetido a uma corrente elétrica por 1 hora e 40 minutos. Transcorrido o tempo de transferência, o sanduíche foi desmontado e a membrana lavada com PBST (PBS 1X mais 0,1% Tween 20). Após isso, a membrana foi adicionada à solução de bloqueio (5g de leite desnatado em 100 ml de PBST) e incubada por 1 hora de agitação, então, a solução de bloqueio foi removida lavando a membrana com PBST.

O anticorpo primário diluído em PBST foi adicionado e a reação incubada por uma hora sob agitação. O soro diluído foi removido, a membrana novamente lavada e o conjugado diluído com PBST foi adicionado e incubado por mais uma hora de agitação. Então, o conjugado foi removido e a membrana lavada com 10 ml de PBST. O aparecimento das bandas coloridas foi controlado visualmente e após a reação a membrana foi lavada com água destilada para que todo o excesso da solução reveladora fosse tirado.

#### 4.2.8 Construção de vetores para expressão heteróloga em *K. phaffii* GS 115 a partir do gene da CP dos “styloviruses” para produção de antissoro policlonal

O sistema de expressão foi escolhido após problemas com a expressão das proteínas em *E. coli*. O sistema em *Komagataella phaffii* foi selecionado por possuir uma maior produtividade, crescimento em meio com metanol que evita contaminação e uma melhor secreção do produto recombinante em fração solúvel. O vetor pPIC9 (figura 4.8) *Invitrogen*, possui uma marca auxotrófica HS4 que permite o crescimento de clones transformantes em meio sem histidina. A presença do promotor do gene AOX 1 confere uma vantagem a esse sistema, em que a expressão de genes que podem ser deletérios para a célula acaba sendo controlada por esse promotor até que a célula atinja altas densidades.



**Figura 4.8:** Representação esquemática do vetor pPIC9 *Invitrogen*. Na figura é possível ver o promotor do gene AOX 1 de *K. phaffii* (5' AOX 1), o peptídeo sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* (S), o terminador de transcrição do gene AOX 1 de *K. phaffii*, a origem de replicação de *E. coli* (ColE1), a marca de seleção pelo antibiótico Ampicilina e múltiplos sítios de restrição de enzimas. Disponível em: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/ppic9\\_map.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/ppic9_map.pdf)

Os iniciadores senso e antisense foram desenhados de forma a amplificar apenas a região codificadora da proteína CP, a partir do códon de iniciação da tradução. Estes iniciadores foram denominados Sty1\_PP\_CPFor (senso) e Sty1\_PP\_CPHisRev (antisense) para StyMaV-1, Sty2\_PP\_CPFor (senso) e Sty2\_PP\_CPHisRev (antisense) para StyMaV-2, Sty3\_PP\_CPFor (senso) e Sty3\_PP\_CPHisRev (antisense) para StyYMV (tabela 4.4).

Os iniciadores senso possuem um sítio de restrição para a enzima *XhoI* na porção N-terminal. Já os iniciadores antisense possuem na porção C-terminal uma sequência que codifica

para a cauda de histidina (his-tag) e um sítio para a enzima de restrição *NotI* (tabela 4.4). A presença desses sítios é importante para que, no momento da digestão do vetor pPIC9 usando essas enzimas, o sinal de secreção seja mantido.

**Tabela 4.4:** Iniciadores sintetizados para amplificação dos genes da CP dos “styloviruses”.

Nome do iniciador	Sequência*	Orientação	Sítio de restrição
Sty1_PP_CPFor	5' <u>CTCGAG</u> AAAAGAGACGCTGAAGCT GCAACTAGGAGTGGTGGTGGACAG3'	senso	<i>XhoI</i>
Sty1_PP_CPHisRev	5' <u>GCGGCCG</u> CTTAGTGGTGGTGGTGA TGATGTATTGCTATATTAGTTCCTGC3'	antisenso	<i>NotI</i>
Sty2_PP_CPFor	5' <u>CTCGAG</u> AAAAGAGACGCTGAAGCT TCAGGATCAATTGAGGGTGGGATTC3'	senso	<i>XhoI</i>
Sty2_PP_CPHisRev	5' <u>GCGGCCG</u> CTTAGTGGTGGTGGTGGTGA TGTATGGTTATACTAGTTCCTTGCATACC3'	antisenso	<i>NotI</i>
Sty3_PP_CPFor	5' <u>CTCGAG</u> AAAAGAGACGCTGAAGCT ACAAATCGAAGAGCACGAGAAGCC3'	senso	<i>XhoI</i>
Sty3_PP_CPHisRev	5' <u>GCGGCCG</u> CTTAGTGGTGGTGGTGGTGA TGATGCGCGCACCCCTCACGTTGTGG3'	antisenso	<i>NotI</i>

\*Os seis primeiros nucleotídeos sublinhados correspondem à sequência dos sítios de restrição.

Os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor pPIC9 (anexo I-5), porém, antes dos fragmentos de PCR serem ligados ao vetor, ele foi digerido usando as enzimas *XhoI* e *NotI* (Anza) com o auxílio do tampão Anza Red Buffer 10X de acordo com o protocolo de digestão dupla fornecido pelo aplicativo do fabricante (anexo I-10). O processo de digestão ocorreu a 37°C por 16 horas. O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose (AMRESCO®) 1%, submetido à eletroforese com tampão de corrida TBE 0,5x (45 mM de Tris-borato; 1 mM de EDTA) e analisados no programa *GeneSyn*.

O fragmento com tamanho correspondente ao vetor pPIC 9 (8 kb) foi extraído do gel com lâmina de bisturi e purificado seguindo instruções do kit comercial GFX PCR DNA and *Gel Band Purification* (GE Healthcare) (anexo I-4). Os fragmentos amplificados, correspondentes aos genes da CP dos stylovirus, foram então ligados ao vetor pPIC9 (Thermo Fisher Scientific) usando a enzima T4 ligase (Promega) e Buffer 5X (Promega), seguindo as instruções do fabricante (anexo I-5). Os produtos da ligação foram utilizados para a transformação e clonagem (anexo I-6) em células de *E. coli* DH10β (Invitrogen) eletrocompetentes (anexo I-7)

de acordo com o manual Sambrook & Russel (2000). Colônias positivas foram selecionadas em meio LB (Luria-Bertani) seletivo com o antibiótico ampicilina (50 µg/ml).

Os DNAs recombinantes (pPIC9+CPs) foram confirmados primeiramente por PCR de colônia usando *Taq Platinum DNA Polymerase* (anexo I-3) e depois por dupla digestão usando as enzimas *Xho I* e *Not I*. Após essa seleção, foram isolados e purificados com o *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) seguindo as instruções do fabricante (anexo I-4) e utilizados para a transformação em células de expressão de *K. phaffii* GS115.

Após amplificação e clonagem, os plasmídeos contendo as CPs dos styloviruses foram linearizados com a enzima *Sall* (anexo I-10). Uma colônia da levedura *K. phaffii* foi inoculada em 5 ml de meio YPD em Erlenmeyer de 125 ml e incubada a 28 °C sob agitação (200 RPM) por 24 horas. Foi adicionado 1 ml do pré-inóculo a 100 ml de meio YPD. As células cresceram durante 16 horas até atingir OD 600 entre 1,3-1,5. Em seguida as células foram centrifugadas a 1.500 g por 5 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 ml de água estéril e gelada. Posteriormente, foram centrifugadas nas mesmas condições, novamente o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 50 ml de água estéril gelada. Após a repetição desse último procedimento as células foram ressuspensas em 4 ml de sorbitol 1 M gelado. Depois de uma nova centrifugação, nas mesmas condições anteriores, as células foram ressuspensas em 200 µl de sorbitol 1 M gelado e mantidas no -20°C até o momento do uso.

Em 80 µl das células foi adicionado de 5-10 µg de DNA e 300 µl de sorbitol 1 M gelado. Então, essas células, serão transferidas para a cubeta de transformação (0,2 cm) gelada, serão eletroporadas e imediatamente após o choque, será adicionado 600 µl de sorbitol 1 M gelado na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo estéril e as células foram plaqueadas em meio MD-ágar. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. A linhagem de laboratório transformada por eletroporação foi a GS115 de *K. phaffii*.

### **4.3 RESULTADOS**

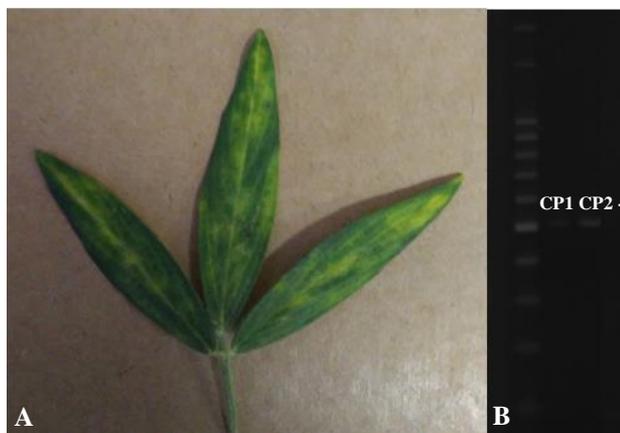
Neste capítulo, os ensaios de transmissão com mosca branca realizados nas instalações de casa de vegetação da Embrapa Gado de Corte e da Estação Experimental de Biologia apresentaram resultados positivos quanto à transmissão dos styloviruses por mosca branca MEAM 1 em duas cultivares de estilosantes (Mineirão e Bela). Visando produzir antissoro

policlonal como uma ferramenta de detecção desses vírus, foram construídos vetores para expressão heteróloga a partir da proteína da capa proteica (CP) dos stylovíruses.

#### 4.3.1 Ensaio de transmissão com mosca branca na Embrapa CNPGC

O ensaio de transmissão com mosca branca foi realizado e as plantas sintomáticas foram submetidas à detecção por RT-PCR. Amostras do acesso GC 984 do campo experimental que apresentava sintomas de mosaico e onde as moscas foram coletadas, foram submetidas à detecção por RT-PCR usando os oligonucleotídeos específicos (tabela 4.1) e a presença dos vírus StyMaV-1 e StyMaV-2 foi confirmada co-infectando apenas uma amostra, no entanto, o vírus StyYMV não foi detectado nas amostras desse ensaio.

Após 15 dias de inoculação dos vírus através das moscas brancas em plantas sadias, sintomas de mosaico típicos de potyvirus foram observados (figura 4.9-A). Os vírus Stylo mosaic-associated virus 1 (StyMaV-1) e Stylo mosaic-associated virus 2 (StyMaV-2) foram detectados co-infectando apenas uma amostra das 20 usadas no ensaio de transmissão (figura 4.9-B), juntamente com um outro vírus que até então não havia sido relatado infectando estilosantes.



**Figura 4.9:** A) Sintomas virais em amostra de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão após transmissão por mosca branca. Sintomas de mosaico e amarelecimento foram observados e a presença dos vírus StyMaV-1 e StyMaV-2 foi confirmada por RT-PCR na mesma amostra. B) Os fragmentos amplificados nas reações de PCR possuem 1,5pb que correspondem às regiões Nib (parcial) e CP desses vírus. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% com tamanho de 500 pb para cada vírus de acordo com o marcador de 100 pb da *Ludwig*.

Além desses vírus, em 15 amostras foram observados sintomas de mancha angular (figura 4.10-A) nas folhas, semelhantes aos sintomas causados por *Carlavirus*. Sendo assim, foi feita a detecção por RT-PCR usando oligonucleotídeo universal para *Carlavirus* e que amplifica a proteína do capsídeo (CP). Os produtos de PCR foram submetidos ao sequenciamento via

Sanger e a análise da sequência confirmou a presença do *Carlavirus Cowpea mild mottle virus* (CPMMV).

O CPMMV é transmitido por mosca branca, um vírus comum em leguminosas, mas que até então, não havia sido detectado em estilosantes. Os resultados mostraram que este vírus é capaz de ser transmitido para estilosantes pelas moscas brancas virulíferas presentes no campo experimental e utilizadas nos experimentos de transmissão (figura 4.10-B). O CPMMV foi detectado no acesso GC 984 do campo experimental e usado como controle positivo na detecção do vírus via PCR. Das 20 plantas usadas no ensaio, 4 morreram, 15 estavam infectadas apenas pelo CPMMV e uma amostra com co-infecção de StyMaV-1, StyMaV-2 e CPMMV.

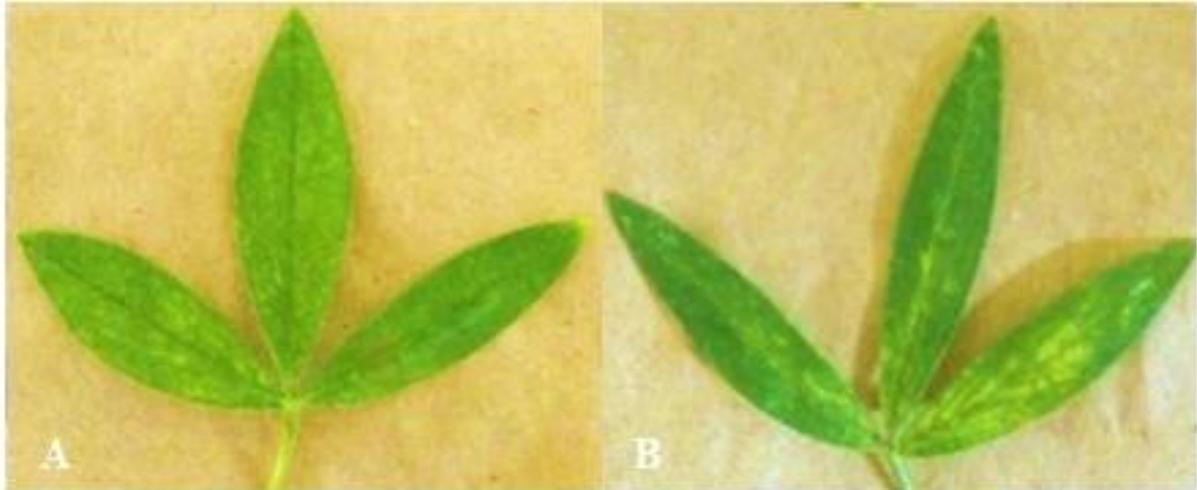


**Figura 4.10:** A) Sintomas virais (mosaico e amarelecimento) em amostra de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão em uma das amostras após transmissão por mosca branca. A presença do vírus CPMMV (*Carlavirus*) foi confirmada por RT-PCR. B) O fragmento amplificado que corresponde a CP do *Carlavirus* foi visualizado em gel de agarose 1% com tamanho de 500 pb de acordo com o marcador de 100 pb da *Ludwig*.

#### 4.3.2 Inoculação mecânica em *Stylosanthes guianensis* cvs. Mineirão e Bela

Após a confirmação dos isolados por RT-PCR, foi detectada a presença do vírus StyMaV-2 co-infectando apenas uma planta de estilosantes Bela e a presença do isolado StyYMV em 31 plantas de estilosantes, sendo 14 da cultivar Mineirão e 17 da cultivar Bela. Um total de 14 em 20 plantas de estilosantes Mineirão e um total de 18 em 20 plantas de estilosantes Bela inoculadas, apresentaram sintomas de infecção viral.

Os sintomas entre esses isolados variaram, sendo que a amostra infectada por StyMaV-2 apresentou mosaico moderado (figura 4.11-A) e as amostras infectadas por StyYMV apresentaram mosaico amarelo (figura 4.11-B). Um total de 8 plantas morreram: 6 da cultivar Mineirão e 2 da cultivar Bela

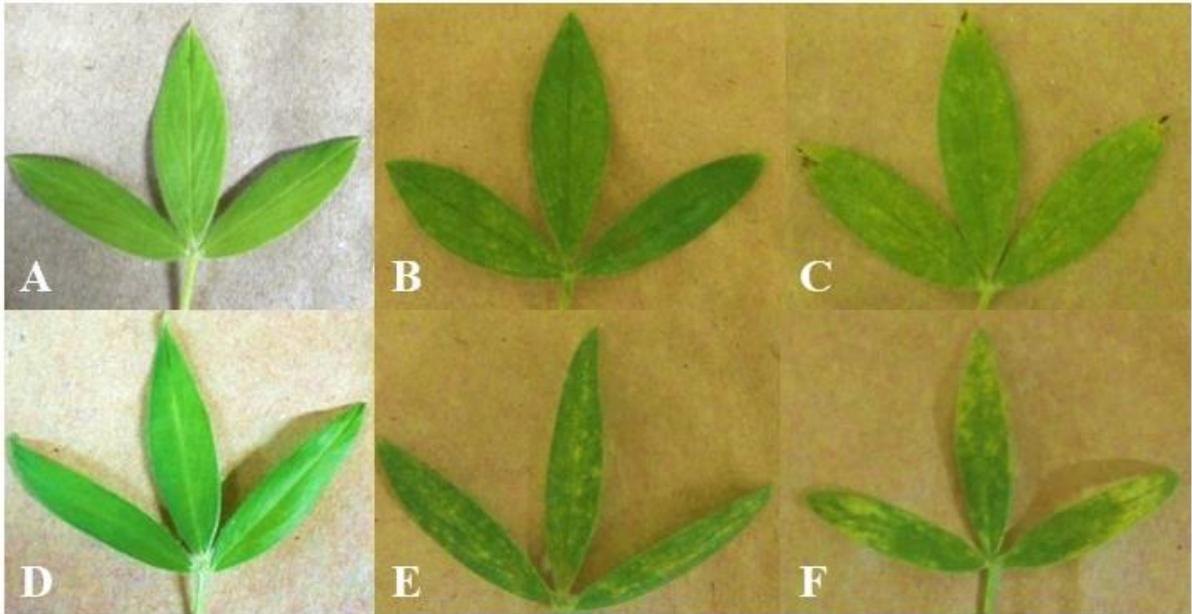


**Figura 4.11: Resultados da inoculação mecânica de styloviruses.** A) Trifólio *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão com sintomas de mosaico moderado causado pelo StyMaV-2 B) Trifólio de *Stylosanthes guianensis* cv. Bela com sintomas de mosaico amarelo causado pelo StyYMV.

#### **4.3.3 Ensaio de transmissão com mosca branca na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (EEB-UNB)**

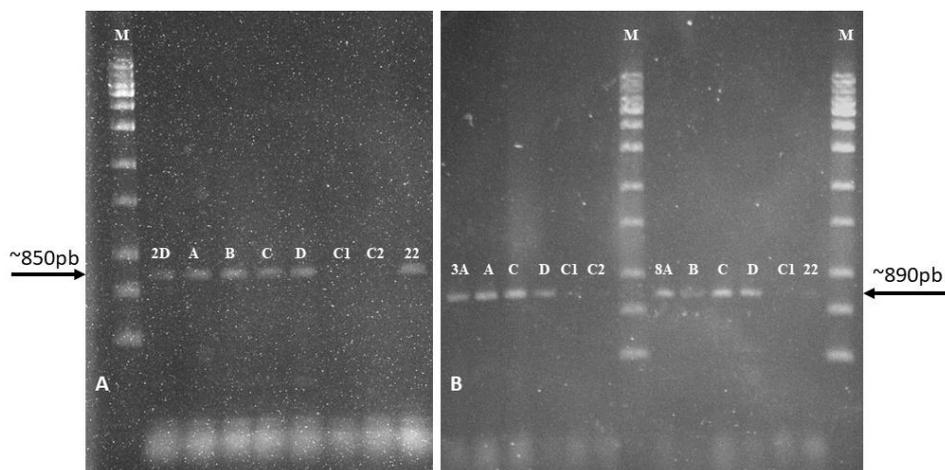
O ensaio de transmissão com mosca branca foi realizado e após 21 dias entre o período de aquisição e transmissão, os primeiros sintomas foram observados, porém, a detecção dos vírus de estilosantes foi realizada 24 dias após a aparição dos primeiros sintomas. Procedeu-se a extração de RNA total, em seguida foi feita a detecção via RT-PCR como descrito no mesmo item 4.2. As plantas referentes aos controles negativos também foram coletadas e testadas (figura 4.12-A e figura 4.12-D).

As plantas de estilosantes cvs. Mineirão e Bela, inseridas nas gaiolas contendo os isolados anteriormente adquiridos por moscas brancas, apresentaram sintomas que variaram entre mosaico moderado (figura 4.12-B e figura 4.12-E) a mosaico amarelo intenso (figura 4.12-C e figura 4.12-F). Os trifólios sintomáticos foram coletados para posterior detecção e foi confirmada a presença dos vírus StyMaV-2 e StyYMV nas duas plantas de estilosantes Mineirão e de estilosantes Bela que foram inseridas na gaiola juntamente com os isolados virais testados. Houve transmissão dos isolados 2D, 3A, 3C, 8A e 8C para as plantas de estilosantes cvs. Mineirão e Bela.



**Figura 4.12: Resultado da transmissão de styloviruses via mosca branca.** A) Trifólio de estilosantes cv. Mineirão. Controle negativo B) Trifólio de estilosantes cv. Mineirão com o isolado 2D (StyMaV-2) após transmissão por mosca branca, apresentando sintomas de mosaico moderado C) Trifólio de estilosantes cv. Mineirão com o isolado 3A (StyYMV) após transmissão por mosca branca, apresentando sintomas de mosaico amarelo intenso D) Trifólio de estilosantes cv. Bela. Controle negativo E) Trifólio de estilosantes cv. Bela com o isolado 2D (StyMaV-2) após a transmissão por mosca branca, apresentando sintomas de mosaico moderado. Trifólio de estilosantes cv. F) Trifólio de estilosantes cv. Bela com o isolado 3A (StyYMV) após transmissão por mosca branca, apresentando sintomas de mosaico amarelo intenso.

A detecção dos vírus via RT-PCR específico nas plantas testadas demonstrou que o isolado 2D foi transmitido para as quatro plantas inoculadas, duas de estilosantes Mineirão e duas de estilosantes Bela (figura 4.13-A), o isolado 3A foi transmitido para uma de Mineirão e duas de estilosantes Bela (figura 4.13-B), o isolado 3C foi transmitido para uma de Mineirão e uma de Bela, o isolado 8A foi transmitido para duas de estilosantes Bela apenas e o isolado 8C foi transmitido para duas de estilosantes Mineirão e uma planta de estilosantes Bela (figura 4.13-B).



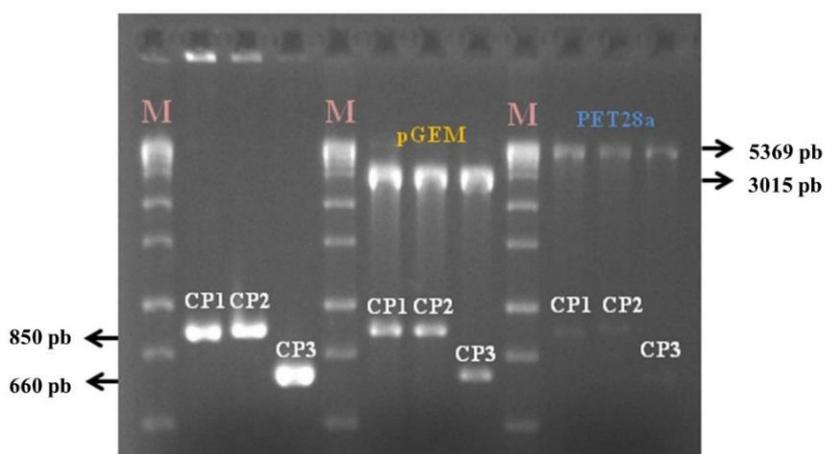
**Figura 4.13:** A) Transmissão por mosca branca do isolado 2D (StyMaV-2) para duas plantas de estilosantes cv. Mineirão (A e B) e duas plantas da cv. Bela (C e D), C1 é o controle negativo do experimento com mosca branca, C2 é o controle negativo da PCR (com água) e 22 é o acesso GC 22 usado no sequenciamento via HTS contendo os vírus de estilosantes (StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV). B) Transmissão por mosca branca dos isolados 3A e 8A (StyYMV) para duas plantas de estilosantes cv. Mineirão (A e B) e quatro da cv. Bela (C e D), em ambos isolados, C1 é o controle negativo do experimento com mosca branca, C2 é o controle negativo da PCR (com água) e 22 é o acesso GC 22. O marcador molecular usado foi de 1kb da Ludwig e os fragmentos amplificados possuem aproximadamente 850 e 890 pb que correspondem aos genes da CP do StyMaV-2 e StyYMV, respectivamente.

#### 4.3.4 Produção de antissoro policlonal a partir do gene da capa proteica (CP) dos “styloviruses”

Inicialmente, como relatado nos Materiais e Métodos foi utilizado o sistema de expressão em *E. coli* para a produção da proteína da CP dos vírus StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV. Porém, devido a uma baixa quantidade de proteína expressa no sobrenadante, o sistema de expressão em *K. phaffii* foi escolhido e usado com o intuito de obter as proteínas expressas em grande quantidade na solução aquosa e “pré-purificadas”.

#### 4.3.5 Análises de vetores para expressão heteróloga em *E. coli* SHuttle a partir do gene da CP dos “styloviruses” para produção de antissoro policlonal

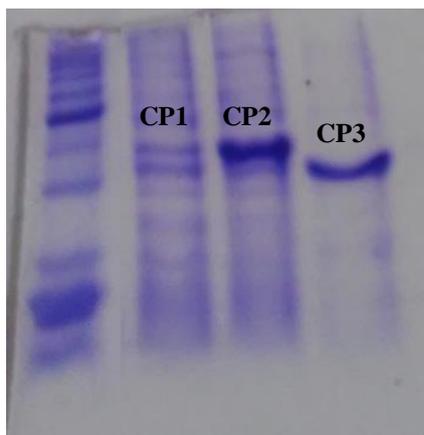
Os genes foram amplificados usando os iniciadores específicos (tabela 4.2) por RT-PCR, clonados em pGEM-T *Easy*, digeridos, sequenciados por Sanger e clonados no vetor pET28 (figura 4.14) conforme descrito na metodologia do item 4.2.4 deste capítulo. Todos os fragmentos amplificados foram confirmados por sequenciamento via Sanger.



**Figura 4.14:** Os fragmentos amplificados nas PCRs e as digestões dos vetores pGEM e pET28a foram visualizados em gel de agarose 1%. CP1 e CP2 com amplicons de 850 pb, CP3 com 660 pb e os vetores pGEM e pET28a apresentando fragmentos correspondentes a 3015 pb e 5369 pb respectivamente de acordo com o marcador de 1000 kb da Ludwig.

#### 4.3.6 Expressão e purificação das proteínas CP dos “styloviruses”

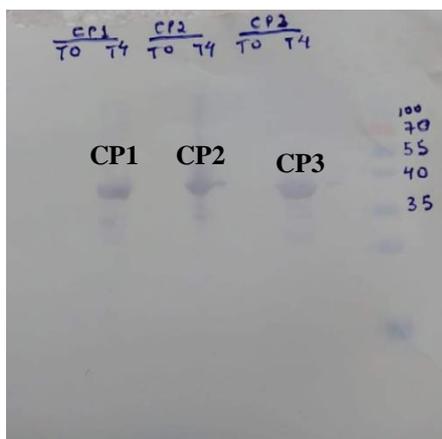
As proteínas então foram expressas em *E. coli* e a confirmação dessa expressão ocorreu após a visualização das proteínas em gel de poliacrilamida das frações solúveis e insolúveis. Foi possível observar a presença das proteínas apenas na fração insolúvel como mostra a figura abaixo (figura 4.15).



**Figura 4.15:** Gel de poliacrilamida da fração insolúvel mostrando a expressão das proteínas em *E. coli* no vetor pET28a. De acordo com o marcador *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen), as proteínas CP1, CP2 e CP3 (correspondendo a StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV, respectivamente) possuem 37kDa, 38kDa e 26kDa contando com a cauda de histidina que foi adicionada.

#### 4.3.7 Análises dos transformantes de *E. coli* por Western Blotting

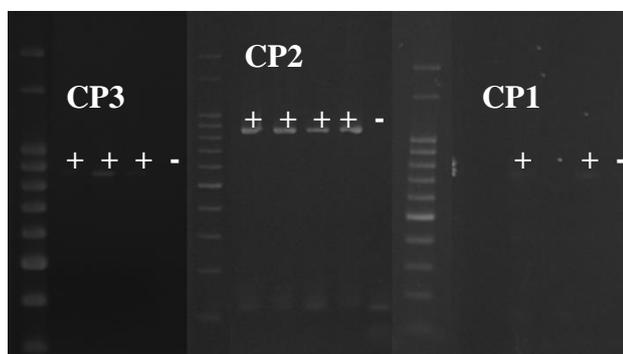
Os transformantes também foram analisados e confirmados por Western Blotting (figura 4.16), porém, devido uma alta expressão das proteínas na fração insolúvel, o sistema de expressão em *E. coli* tornou-se inviável para a expressão dessas proteínas já que o objetivo era obter as proteínas na fração solúvel para que fossem purificadas e posteriormente inoculadas nos camundongos para a produção dos antissoros. Dessa forma, outro sistema de expressão foi escolhido, no caso em *K. phaffii*.



**Figura 4.16:** Western Blotting com o anti-his confirmou a expressão das proteínas em *E. coli* no vetor pET28a. Os tempos T0 e T4 (da fração insolúvel) equivalem aos períodos antes e após a expressão. O tamanho das proteínas CP1, CP2 e CP3 foi confirmado e possuem 37kDa, 38kDa e 26kDa (correspondendo a CP de StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV) respectivamente, de acordo com o marcador de proteína *PageRuler Protein Ladder* (ThermoFisher).

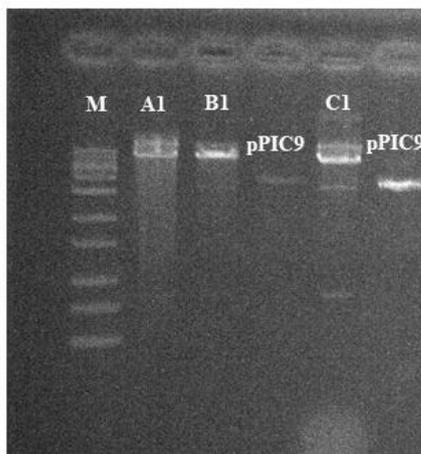
#### 4.3.8 Análises de vetores para expressão heteróloga em *K. phaffii* GS 115 a partir do gene da CP dos “styloviruses” para produção de antissoro policlonal

Os genes foram amplificados por RT-PCR (figura 4.17) utilizando os iniciadores específicos e a metodologia descrita no item 4.3.7 deste capítulo. Os fragmentos amplificados foram clonados e digeridos. Os clones selecionados foram sequenciados por Sanger.



**Figura 4.17:** Os fragmentos amplificados nas PCRs foram visualizados em gel de agarose 1%. CP1, CP2 e CP3 (correspondendo a CP de StyMaV-1, StyMaV-2 e StyYMV) com amplicons de 750 pb, 850 pb e 800 pb respectivamente de acordo com o marcador de 100 pb da *Ludwig*.

Após amplificação e clonagem, os plasmídeos contendo as CPs dos “styloviruses” foram linearizados com a enzima *SalI* (figura 4.18) para depois serem transformados nas leveduras, pois a linearização nesse ponto gera uma molécula de DNA com extremidades recombinantes homólogas ao gene *his4* da levedura.



**Figura 4.18:** Eletroforese em gel de agarose 1%. Fragmentos de DNA após as digestões com enzima SalI. Clones A1: CP do StyMaV-1 com o vetor pPIC9, clone B1: CP do StyMaV-2 com o vetor pPIC9 e clone C1: CP do StyYMV com o vetor pPIC9. Os fragmentos correspondem a 8800pb à direita, o vetor pPIC9 vazio com um fragmento que corresponde a 8000pb de acordo com o marcador molecular (M) de 1kb da *Ludwig*.

#### 4.4 DISCUSSÃO

Esse trabalho possibilitou a descoberta do inseto vetor envolvido na transmissão dos vírus de estilosantes, os “styloviruses”. Tanto os dois novos vírus que compõem um novo gênero (Stylomovirus) dentro da família *Potyviridae*, denominados até o momento de Stylo mosaic-associated virus 1 (StyMaV-1) e Stylo mosaic-associated virus 2 (StyMaV-2), quanto a nova espécie, Stylo yellow mosaic virus (StyYMV), pertencente a um gênero já existente, *Roymovirus*, são transmitidos por mosca branca Middle East-Asia Minor 1 (MEAM 1), anteriormente, *Bemisia tabaci* biótipo B.

Esses resultados trouxeram informações científicas inéditas como a comprovação que o novo gênero proposto (tentativamente denominado “Stylomovirus”) composto pelas espécies StyMaV-1 e StyMaV-2 são transmitidos por moscas brancas. Este fato agrega mais um gênero pertencente à família *Potyviridae* transmitidos por esses insetos, juntamente com os *Ipomovirus*. Os resultados também demonstram que o StyYMV pertencente a um gênero já existente (*Roymovirus*), pode ser transmitido por mosca branca. Até o presente, a espécie tipo do gênero *Roymovirus* o *Rose yellow mosaic virus* (RoYMV) não possui vetor identificado.

Os ensaios de transmissão com mosca branca, possibilitaram ainda, o primeiro relato do *Carlavirus Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) infectando estilosantes em condições naturais presente no acesso GC 984 em campo experimental, usado no ensaio de transmissão realizado na Embrapa Gado de Corte, porém, ausente nos acessos GC 22 e GC 23 que foram submetidos ao sequenciamento do RNA total via HTS. O CPMMV é responsável pela doença denominada necrose da haste em soja e é um vírus que afeta também outras leguminosas como amendoim e feijão e potencialmente pode se tornar um problema fitossanitário importante (Muniyappa & Reddy, 1983).

Além disso, a detecção do CPMMV em estilosantes no campo, demonstram que essa leguminosa forrageira representa um reservatório deste vírus podendo desempenhar um papel importante como fonte de inóculo para outras leguminosas. Os vírus de planta são um dos grandes causadores de perdas econômicas da agricultura, podendo causar perdas anuais de até 50 bilhões de euros (Pallás *et al.*, 2018). O processo de transmissão dos vírus de planta é uma etapa fundamental e que ocorre antes do ciclo de infecção contando com o auxílio de diferentes

organismos vetores que podem ser diferentes espécies de insetos (afídeos, ácaros, moscas brancas, tripes etc.), nematoides e até mesmo oomicetos (Fajardo & Nickel, 2019).

Os membros da família *Potyviridae* podem ser transmitidos por afídeos como os que compõem os gêneros *Macluravirus* e *Potyvirus*, oomicetos como os membros do gênero *Bymovirus*, podem ser transmitidos de forma não persistente ou semi-persistente por diferentes espécies de ácaros como ocorre nos gêneros *Poacevirus*, *Tritimovirus* e *Rymovirus*, como também por moscas brancas que é o caso dos gêneros *Ipomovirus* (Koch *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2013; Dombrovsky *et al.*, 2014; Biancard & Tamada, 2016; Tatineni *et al.*, 2018).

Sendo assim, é importante adotar medidas específicas e eficazes quanto ao controle dos vírus de planta, medidas essas que devem prevenir, dificultar ou retardar a entrada do vírus na célula hospedeira evitando assim a dispersão de planta a planta (Fajardo & Nickel, 2019). Tais medidas podem ocorrer de algumas formas como: o uso de sementes ou material propagativo livre de vírus, o uso de cultivares tolerantes ou resistentes, o uso de barreiras vegetais contra o vetor e até mesmo a antecipação da semeadura ou transplante das plantas em campo (Pereira-Carvalho & Costa, 2015).

No entanto, antes de implementar qualquer medida de controle, é importante detectar e caracterizar corretamente os vírus (Fajardo & Nickel, 2015). Dessa forma, diversos métodos de diagnose são usados com o intuito de identificar e caracterizar esses patógenos tais como: sequenciamento de alto desempenho, microscopia eletrônica para observar o tipo de partícula, detecção por PCR convencional e qPCR usando oligonucleotídeos específicos ou universais, micro arranjos e testes sorológicos usando antissoros policlonais (Jeong *et al.*, 2014; Hadidi *et al.*, 2016).

Nesse trabalho também foi possível realizar a construção de vetores para expressão heteróloga a partir da CP dos styloviruses, com o intuito de futuramente produzir antissoro policlonal que servirá como ferramenta de detecção em larga escala desses vírus em plantas infectadas. A utilização dessa ferramenta de detecção em larga escala pode dar suporte e agilizar a seleção de genótipos resistentes a esses vírus, no âmbito dos Programas de Melhoramento de Plantas Forrageiras da Embrapa Gado de Corte (CNPGC- MS).

#### **4.5 CONCLUSÃO**

O primeiro ensaio de transmissão realizado na Embrapa CNPGC-MS, revelou que as duas novas espécies (StyMaV-1 e StyMaV-2) que compõe um novo gênero (*Stylomovirus*) dentro da família *Potyviridae*, são transmitidas para estíloantes cv. Mineirão através do inseto vetor

mosca branca, MEAM 1. Esse mesmo ensaio, também possibilitou o primeiro relato no Brasil do *Carlavirus* CPMMV, um vírus comumente encontrado em leguminosas, infectando estilosantes em condições de campo.

Devido uma baixa taxa de infecção dos StyMaV-1 e StyMaV-2, houve a necessidade de realizar um outro ensaio para que pudesse corroborar esses dados, realizado na Estação de Biologia da UnB (EEB-UnB). O novo ensaio confirmou a transmissão do vírus StyMaV-2 por mosca branca, além de ter revelado que o novo membro do gênero *Roymovirus*, Stylo yellow mosaic virus (StyYMV) também é transmitido por mosca branca. Essa transmissão ocorreu tanto em plantas de estilosantes da cultivar Mineirão, quanto em plantas de estilosantes da cultivar Bela, lançada em 2019 pela Embrapa Gado de Corte.

A cultivar Bela mostrou-se altamente suscetível aos vírus de estilosantes, sendo facilmente infectada tanto por inoculação mecânica quanto através da transmissão por mosca branca apresentando sintomas de mosaico intenso e severo. Esses resultados, ajudam a propor medidas de controle preventivas, a realizar o manejo adequado de estilosantes em campo e a entender as relações agroecológicas existentes dentro desse patossistema. Quanto à produção de antissoros policlonais a partir das CPs dos stylovirus, foi usado inicialmente o sistema de expressão heteróloga bacteriano em *E. coli*.

Porém, devido à baixa produção das proteínas no sobrenadante e a formação de corpos de inclusão que dificultam o dobramento normal da proteína, esse sistema de expressão foi substituído por outro baseado em leveduras. Sendo assim, o sistema de expressão em levedura *K. phaffii*, anteriormente denominada como *Pichia pastoris*, foi usado, já que utiliza o metanol como única fonte de carbono, evitando assim, possíveis contaminações no meio de crescimento. Essa levedura secreta poucas proteínas endógenas, além de direcionar a proteína expressa para uma via secretória.

A construção de vetores para expressão heteróloga possibilita uma nova etapa, como as fases de expressão dessas proteínas em *K. phaffii* para posterior purificação das mesmas e por fim, realizar a produção dos antissoros policlonais. Esses antissoros poderão ser usados como ferramenta de detecção em larga escala desses vírus em plantas infectadas. A utilização dessa ferramenta de detecção em larga escala pode dar suporte e agilizar a seleção de genótipos resistentes a esses vírus, no âmbito dos Programas de Melhoramento de Forrageiras da Embrapa Gado de Corte (CNPGC).

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae* (2005). *Archives of Virology*, 150: 459–479p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0440-6>

ALA-POIKELA, M.; GOYTIA, E.; HAIKONEN, T.; RAJAMAKI, M. L.; VALKONEN, J. T. Helper component proteinase of genus *Potyvirus* is an interaction partner of translation initiation factor eIF(iso)4E and eIF4E that contains a 4E binding motif (2011). *Journal of Virology*, 85: 6784-6794p. DOI: <https://doi.org/JVI.00485-11>

BASSO, M. F.; FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; AYUB, R. A.; NICKEL, O. Produção de antissoro policlonal utilizando a proteína capsidial recombinante do Rupestris stem pitting-associated virus (2010). *Ciência Rural*, 40: 2385-2388p. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010001100022>

BIANCARD, E.; TAMADA, T. *Rhizomania*. Switzerland: Springer, 2016. 155p.

BERKMEN, M. Production of disulfide-bonded proteins in *E. coli* (2012). *Protein Expression and Purification*, 82(1): 240-251p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.10.009>

BROWN, T. A. *Gene cloning & DNA analysis and introduction* (2010). Wiley Blackwell, 6<sup>a</sup>ed, 338p.

COSTA, T. M.; INOUE-NAGATA, A. K.; VIDAL, A. H.; RIBEIRO, S. G.; NAGATA, T. The recombinant isolate of cucurbit aphid-bourne yellows virus from Brazil is a polerovirus transmitted by whiteflies (2020). *Plant Pathology*, (69)6: 1042-1050p. DOI: <http://doi.org/10.1111/ppa.13186>

DOMBROVSKY, A.; REINGOLD, V.; ANTIGUNUS, Y. *Ipomovirus*: an atypical genus in the Family *Potyviridae* transmitted by whiteflies (2014). *Pest Manag Sci*, 70: 1552-1567p. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3735>

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas (2015). Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves- RS (Comunicado Técnico, 179). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131838/1/Comunicado-Tecnico-179.pdf>. Acesso em: 11.07.2021.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas (2019). Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves- RS (Comunicado Técnico, 110). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195251/1/Doc110.pdf> Acesso em: 30.08.2021

HADIDI, A.; FLORES, R.; CANDRESSE, T.; BARBA, M. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology (2016). *Frontiers in Microbiology*, 7: 1325p. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01325>

GILBERTSON, R. L.; BATUMAN O.; WEBSTER, C. G.; ADKINS, S. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses (2015). *Annual Review Virology*, 2: 67-93p. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085410>

ICTV. 2021. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>. Acesso em: 30.08.2021

IVANOV, K. I.; ESKELIN, K.; LÖHMUS, A.; MÄKINEN, K. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection (2014). *Journal of General Virology*, 95: 1415-1429p. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.064220-0>

JEONG, J.-J.; JU, H.-J.; NOH, J. A review of a detection methods for the plant viruses (2014). *Research Plant Disease*, 2-(3): 173-181p. DOI: <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>

KANAKALA, S. & GHANIN, M. Advances in the Genomics of the Whitefly *Bemisia tabaci*: An Insect Pest and Virus Vector (2015). *Short Views on Insect Genomics and Proteomics*, 3: 19-40p. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24235-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24235-4_2)

KARINER, F. W.; DIETZSCH, C.; HATEK, T.; HERWIG, C.; SPADIUT, O.; GLIEDER, A. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered metanol utilization pathway (2012). *Microbial Cell Factories*, 11(1): 22p. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-22>

KOCH, K. G.; JONES, T.-K. L.; VARGAS-BADILLO, I. E. Arthropod vectors of plant viruses- mites transmission. In: AWASTHI, L. P. *Applied plant virology- advances, detection and antiviral strategies* (2010). Elsevier, Chapter 26: 349-369p.

KÜBERL, A. F.; SCHNEIDER, J.; ANDERL, I.; THALLINGER, G. G. High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435 (2011). *Journal of Biotechnology*, 154(4): 312-320p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.04.014>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 (1970). *Nature*, (15) 227: 680-683p. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>

MARUBAYASHI, J. M.; YUKI, V. A.; ROCHA, K. C. G.; MITUTI, T.; PELEGRINOTTI, F. M.; FERREIRA, F. Z.; MOURA, M. F.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; PAVAN, M. A. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci*

complex are present in Brazil (2013). *Journal of Applied Entomology*, (137)2: 113-121p. DOI: <http://dx.doi.org/1-.1111/j.1439-0418.2012.01714.v>

MISHRA, R.; VERMA, R. K.; SHARMA, P.; CHOUDHARY, D. K.; GAUR, R. K. Interaction between viral proteins with the transmission of *Potyvirus* (2013). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(2): 240-253p. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.807659>

MUNIYAPPA, V. & REDDY, D. V. R. Transmission of Cowpea mild mottle virus by *Bemisia tabaci* in a nonpersistent manner (1983). *Plant Disease*, St. Paul, 67(4): 391-393p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PD-67-391>

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, E. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies (2011). *Annual Review of Phytopathology*, 49: 219-248p. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>

OLIVEIRA, A. M. E.; CARDOSO, L.; ERICSSON, D. B. C.; XAVIER, A. S.; BICALHO, T. F.; XAVIER, A. R. E. O. Interação vírus/vetor para pulgões (Hemiptera: *Aphididae*) e mosca branca (Hemiptera: *Aleyrodidae*) (2019). *Agrarian Sciences Journal*, 11: 1-12p. DOI: <https://doi.org/10.35699/2447-6218.2019.15153>

PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. A.; JAMES, D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids (2018). *Frontiers in Microbiology*, 9: 2087p. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02087>

PEREIRA-CARVALHO, R. de C.; COSTA, C. L. Controle de viroses de plantas (2015). In: MEDEIROS, R. B. de; RESENDE, R. de O.; PEREIRA-CARVALHO, R. de C.; DIANESE, E. de C.; COSTA, C. L.; SGRO, J-Y. (Eds.). *Virologia Vegetal: conceitos, fundamentos, classificação e controle* (2015). Brasília, DF: Editora UnB, 593-650p.

PETERSEN, S. M.; KEITH, C.; AUSTIN, K.; HOWARD, S.; SU, L.; QIU, W. A natural reservoir and transmission vector of grapevine vein clearing virus (2019). *Plant Disease*, 103: 571-577p. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1073-RE>

SAMBROOK, J & RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2000). CSHL PRESS, 3<sup>a</sup> ed, v 1. Protocol 17: Directional cloning into plasmid vectors. Chapter 1: Plasmids and their usefulness in Molecular Cloning, 1.84-1.87p.

SØRENSEN, H. P. Towards universal systems for recombinant gene expression (2010). *Microbial Cel Factories*, 9(27): 1-4p. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-927>

TATINENI, S.; McMECHAN, A. J.; HEIN, G. L. *Wheat streak mosaic virus* coat protein is a determinant for vector transmission by the wheat curl mite (2018). *Virology*, 514:42-49p.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.10.018>

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals (2010). *Drug Discovery Today*, 15(17-18): 773-780p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.009>

WYLIE, S. J., ADAMS, M., CHALAM, C., KREUZE, J., LOPEZ-MOYA, J. J., OHSHIMA, K., PRAVEEN, S., RABENSTEIN, F., STENGER, D., WANG, A.; ZERBINI, F. M. ICTV virus taxonomy profile: *Potyviridae* (2017). *Journal General Virology*, 98: 352–354p.

DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740>

## CAPÍTULO 5:

### ESTUDOS DAS INTERAÇÕES CELULARES ENTRE OS STYLOVIRUSES E HOSPEDEIRO VEGETAL (*NICOTIANA BENTHAMIANA*) POR EXPRESSÃO TRANSIENTE DE PROTEÍNAS VIRAIS EM ENSAIOS *IN VIVO*

#### RESUMO

As etapas de desencapsidação, replicação do genoma, expressão gênica, supressão do silenciamento e montagem de partícula viral, são etapas primordiais que constituem o ciclo de infecção viral. As proteínas virais se apropriam da maquinaria da célula para que todos esses processos sejam executados. Por serem multifuncionais, essas proteínas interagem umas com as outras formando complexos replicativos resultando em induções celulares e movimento viral. Sendo assim, a localização subcelular das proteínas virais proporciona um indicativo das funções que elas desempenham durante o ciclo de infecção. Na família *Potyviridae*, as informações a respeito das funções das proteínas são bem conhecidas e dependendo do gênero, algumas proteínas estão ausentes e as funções de outras mudam. Quando se trata de um novo gênero dentro da família, novas relações e interações entre proteínas virais e proteínas da hospedeira podem ser descobertas. Para isso, é fusionada nas regiões N ou C terminais das proteínas a serem estudadas uma proteína fluorescente como o GFP (*Green Fluorescent Protein*), transformadas em *A. tumefaciens* para serem agroinfiltradas em *N. benthamiana* e observadas por meio de expressão transiente através de microscopia confocal. Portanto, o objetivo geral desse trabalho foi construir vetores para estudo das interações de proteínas virais e proteínas do hospedeiro no processo de infecção dos styloviruses (StyMaV-2 e StyYMV), vírus recentemente caracterizados infectando estilosantes. Posteriormente, com a produção e comprovação da eficiência desses vetores, será realizada a localização subcelular dessas proteínas e inferir os tipos de relações existentes entre eles durante o processo de infecção na hospedeira.

**Palavras-chave:** *Potyviridae*, StyMaV-2, StyYMV, expressão transiente, interação proteica, microscopia confocal.

## ABSTRACT

The steps of the viral infection process as decapsidation, genome replication, gene expression, suppression of silencing and viral particle assembly are essential steps that follow the viral infection cycle. Viral proteins appropriate the machinery of the cell so that all these processes are carried out. As they are multifunctional, these proteins interact with each other to form replicative complexes resulting in cellular inductions and viral movement. Thus, the subcellular location of viral proteins provides an indication of the functions they play during the infection cycle. In the *Potyviridae* family, information about the functions of proteins is well known and depending on the genus, some proteins are absent and the functions of others change. When it comes to a new genus within the family, new relationships and interactions between viral proteins and host proteins can be discovered. For this, a fluorescent protein such as GFP (Green Fluorescent Protein) is fused in the N or C terminal regions of the proteins to be studied, transformed into *A. tumefaciens* to be agroinfiltrated into *N. benthamina* and observed through transient expression through microscopy confocal. Therefore, the general objective of this work was to build vectors to study the interactions of viral and host proteins in the infection process of styloviruses (StyMaV-2 and StyYMV), recently characterized viruses infecting styloviruses. Later, with the production and proof of the efficiency of these vectors, the subcellular location of these proteins will be performed and the types of relationship between them during the host infection process will be inferred.

**Keywords:** *Potyviridae*, StyMaV-2, StyYMV, transient expression, microscopy confocal.

## 5.1 INTRODUÇÃO

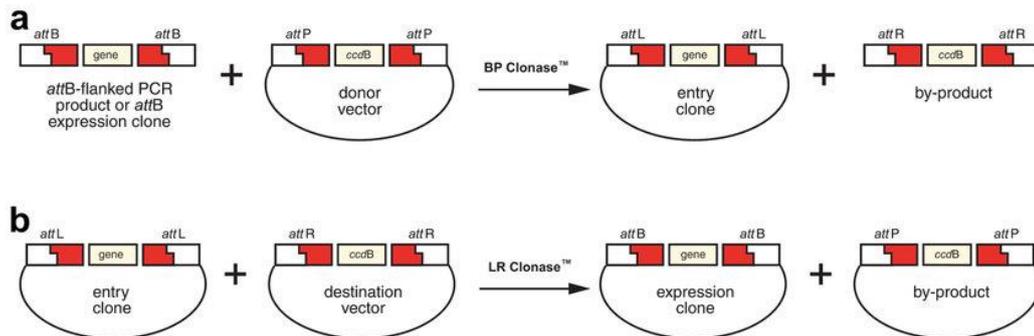
Interações entre proteínas que ocorrem no patossistema vírus/planta podem acontecer de duas maneiras: interações entre as próprias proteínas virais e interações entre as proteínas virais e as proteínas da hospedeira. Conhecer essas interações é importante para entender o processo de infecção viral, uma vez que elas ocorrem, na maioria das vezes, visando o sucesso da infecção. Durante o ciclo de infecção, os vírus recrutam proteínas da hospedeira para executarem o ciclo de infecção que se inicia com a entrada do vírus na célula e finaliza com o movimento célula-a-célula após a montagem do capsídeo.

Para o estudo dessas interações nos sistemas biológicos vírus/plantas, é necessário o uso de diversas ferramentas de análises desenvolvidas a partir de diferentes técnicas moleculares tais como a tecnologia *in vitro* do Sistema Gateway (Fields & Song, 1989) conciliado com a técnica de Microscopia Confocal, por exemplo (Minsky, 1988). O Sistema Gateway consiste em uma recombinação através de clonagens e sub-clonagens que ocorrem após a reação sítio-específica de sequências de cDNAs alvo em vetores especiais.

Uma vez que o cDNA alvo é inserido nesse sistema ele é transferido entre diferentes vetores utilizando locais específicos de recombinação (Chevray & Nathans, 1992). O vetor doador (de entrada) que possuem locais de recombinação específicos (sítios *attP*) permite a recombinação com um vetor de destino (de expressão) para posterior inserção no Sistema Gateway. Quando a recombinação ocorre, o gene presente entre as regiões *attP* substitui o gene cassete (*ccdB*) que codifica para uma proteína letal para bactéria, dessa forma, as colônias apenas com o inserto crescem em um meio seletivo (Karimi *et al.*, 2007).

Após essa etapa de clonagem, ocorre a recombinação desse DNA recombinante em um vetor de destino (expressão). Os vetores de destino possuem locais de recombinação específicos (*attR*) para que ocorra a recombinação entre o vetor de entrada com o vetor de destino e o gene de resistência à canamicina para seleção em *E. coli*, possibilitando um local de clonagem direcional que permite a ligação de produtos de PCR (figura 5.1) (Hanahan, 1983; Inoue *et al.*, 1990; Karimi *et al.*, 2007).

Após obter os DNAs através do Sistema Gateway (figura 5.1), a expressão dessas proteínas pode ser vista a partir da localização subcelular por microscopia confocal. É possível realizar a predição da localização de proteínas virais *in silico*, porém, é mais complicado de ser determinado, sendo assim, uma outra maneira é estudar a localização de proteínas e fusioná-las em proteínas fluorescentes como o *Green Fluorescent Protein* (GFP), por exemplo e realizar a expressão transiente mediada por *A. tumefaciens* em plantas de *N. benthamiana*.



**Figura 5.1:** Representação esquemática das reações de recombinação BP (a) e LR (b) que constituem a base da tecnologia Gateway (Disponível em: Faggionato, 2010).

A identificação de um novo gênero (*Stylomovirus*) e de uma nova espécie viral que pertence a um gênero já existente (*Roymovirus*) dentro da família *Potyviridae* contendo vírus que infectam plantas de estilosantes no campo, evidenciou um novo grupo de patógenos virais capaz de causar danos nessas espécies forrageiras. Considerando que esta representa uma relação nova vírus-hospedeiro, estudos dessas interações são necessários para complementação daqueles já obtidos pela análise genômica dos “styloviruses”.

A identificação de possíveis vias metabólicas decorrentes da interação de proteínas virais e proteínas das plantas hospedeiras poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle visando interferir/bloquear as interações resultantes do processo de infecção dos novos membros da família *Potyviridae* com plantas de estilosantes, isso poderá ser útil para a seleção de genótipos resistentes de estilosantes e os possíveis mecanismos de resistência envolvidos no âmbito do Programa de Melhoramento Genético dessa leguminosa forrageira na Embrapa.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a execução dessas metodologias, folhas de estilosantes (*Stylosanthes guianensis*) cv. Mineirão do acesso GC 22 do campo experimental da Embrapa Gado de Corte, contendo sintomas tipicamente virais como mosaico, foram maceradas em nitrogênio líquido para extração do RNA total (anexo I-1) e posterior amplificação dos genes de interesse a partir de RT-PCR (anexo I-8 e anexo I-14). Esse acesso permanece armazenado em freezer -80°C, no laboratório de virologia vegetal do departamento de biologia Celular da UnB, desde a sua coleta em março de 2013 para posteriores experimentos.

Os vírus *Stylosanthes mosaic-associated virus 2* (StyMaV-2), pertencente ao novo gênero proposto *Stylomovirus*, e o *Stylosanthes yellow mosaic virus* (StyYMV) do gênero *Roymovirus*, foram escolhidos como representantes de cada um dos dois gêneros para realizar as análises de interação entre as proteínas virais com as da hospedeira. Essas interações serão observadas com o auxílio da proteína fluorescente *Green Fluorescent Protein* (GFP) fusionada nas regiões N e C- terminais de cada uma das proteínas selecionadas, P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP, dos dois vírus.

### 5.2.1 Amplificação dos genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV por RT-PCR para os ensaios de recombinação

Para as construções com a fusão do GFP na região N-terminal da proteína, foram inseridos os sítios *attBs* em suas extremidades. No sentido senso foi inserido após o sítio *attB*, uma sequência de Shine-Dalgarno (GAA GGA GAT AGA) que é uma sequência de reconhecimento para expressão procariótica. Em seguida, foi inserida uma sequência de Kozak (ACC) que se trata de uma sequência de reconhecimento para expressão eucariótica. Por fim, um códon de iniciação (ATG ou M) (figura 5.2-A).

Para as construções com a fusão do GFP na região C-terminal da proteína, os sítios *attBs* também foram inseridos, porém, diferente do que foi feito para as construções das fusões na N-terminal. No sentido senso, apenas o sítio *attB* foi inserido, ou seja, nessa construção dispensou-se a presença das sequências de Shine-Dalgarno (GAA GGA GAT AGA) e Kozak (ACC). Já no sentido antisenso, após o sítio *attB*, foi inserido um códon de parada (TTA) (figura 5.2-B).



**Figura 5.2:** Representação esquemática das construções realizadas de acordo com as regiões N e C- terminais das proteínas. A) representação da fusão N-terminal e B) representação da fusão C-terminal, o símbolo em vermelho representa o códon de parada que foi inserido (TTA) no final da proteína.

Amostras de estilosantes infectadas pelos vírus StyMaV-2 e StyYMV foram utilizadas para extração de RNA total usando o reagente comercial *PlantRNA* da *Invitrogen* e purificadas com o kit *RNeasy plant mini-kit* (Qiagen) (anexo I-1). Foram selecionados cinco dos dez genes de cada um dos vírus e os cDNAs para os genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP foram sintetizados usando iniciadores específicos (tabela 5.1).

**Tabela 5.1:** Iniciadores sintetizados para amplificação dos genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV.

Nome do iniciador	Sequência	Orientação
Sty2_P1_N_For	5' attB1-SD-K-M (GCACAGATTGTG) 3'	senso
Sty2_P1_N_Rev	5' attB1 (AAACAATTCTCTAAG) 3'	antisenso
Sty2_HC_N_For	5' attB1- SD-K-M (TCGAAGCACTACTCAC) 3'	senso
Sty2_HC_N_Rev	5' attB1 (ACCAACTGTGTAGTTACC) 3'	antisenso
Sty2_VPg_N_For	5' attB1- SD-K-M (GGGGATGATGTTGATC) 3'	senso
Sty2_VPg_N_Rev	5' attB1 (TTCAAATTCAAACACG) 3'	antisenso
Sty2_NIa_N_For	5' attB1- SD-K-M (GGATCCGGTAGGGTTGG) 3'	senso
Sty2_NIa_N_Rev	5' attB1 (TTGTGGTGATGTGTG) 3'	antisenso
Sty2_CP_N_For	5' attB1- SD-K-M (TCAGGATCAATTGAGGG) 3'	senso
Sty2_CP_N_Rev	5' attB1 (TATGGTTATACTAGTTCC) 3'	antisenso
Sty2_P1_C_For	5' attB1 (AATGGCACAGATTGTG) 3'	senso
Sty2_P1_C_Rev	5' attB1 (AAACAATTCTCTAAG) * 3'	antisenso
Sty2_HC_C_For	5' attB1 (ATCGAAGCACTACTCACAC) 3'	senso
Sty2_HC_C_Rev	5' attB1 (ACCAACTGTGTAGTTACC) * 3'	antisenso
Sty2_VPg_C_For	5' attB1 (AGGGGATGATGTTGATCTC) 3'	senso
Sty2_VPg_C_Rev	5' attB1 (TTCAAATTCAAACAC) * 3'	antisenso
Sty2_NIa_C_For	5' attB1 (AGGATCCGGTAGGGTTGG) 3'	senso

Sty2_NIa_C_Rev	5' attB1 (TTGTGGTGATGTGTG) * 3'	antisenso
Sty2_CP_C_For	5' attB1 (ATCAGGATCAATTGAGGGTG) 3'	senso
Sty2_CP_C_Rev	5' attB1 (TATGGTTATACTAGTTCC) * 3'	antisenso
Sty3_P1_N_For	5' attB1-SD-K-M (GCACCAACCACTTTAC) 3'	senso
Sty3_P1_N_Rev	5' attB1 (CGAAACACCTACATTAATG) 3'	antisenso
Sty3_HC_N_For	5' attB1- <b>SD-K-M</b> (TCACAGTTACACATTTTTG) 3'	senso
Sty3_HC_N_Rev	5' attB1 (ACCAGCTCTGTATTGG) 3'	antisenso
Sty3_VPg_N_For	5' attB1- <b>SD-K-M</b> (GCTAAGAACAAAAAG) 3'	senso
Sty3_VPg_N_Rev	5' attB1 (TTCAAAACGAACAAC TTC 3')	antisenso
Sty3_NIa_N_For	5' attB1- <b>SD-K-M</b> (AGCGCGGGTACTGTTCAAG) 3'	senso
Sty3_NIa_N_Rev	5' attB1 (TTGGTAACTCACCACC) 3'	antisenso
Sty3_CP_N_For	5' attB1- <b>SD-K-M</b> (ACAAATCGAAGAGCAC) 3'	senso
Sty3_CP_N_Rev	5' attB1 (CGCGCACCCCTCACG) 3'	antisenso
Sty3_P1_C_For	5' attB1 (AATGGCACCAACCACTTTAC) 3'	senso
Sty3_P1_C_Rev	5' attB1 (CGAAACACCTAC) * 3'	antisenso
Sty3_HC_C_For	5' attB1 (ATCACAGTTAGACATTTTTG) 3'	senso
Sty3_HC_C_Rev	5' attB1 (ACCAGCTCTGTATTG) * 3'	antisenso
Sty3_VPg_C_For	5' attB1 (AGCTAAGAACAAAAAGTTG) 3'	senso
Sty3_VPg_C_Rev	5' attB1 (TTCAAAACGAACAAC) * 3'	antisenso
Sty3_NIa_C_For	5' attB1 (AAGCGCGGGTACTGTTC) 3'	senso
Sty3_NIa_C_Rev	5' attB1 (TTGGTAACTCACCATC) * 3'	antisenso
Sty3_CP_C_For	5' attB1 (AACAAATCGAAGAGCACGAG) 3'	senso
Sty3_CP_C_Rev	5' attB1 (CGCGCACCCCTCACG) * 3'	antisenso

attB1: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT

attB 2: GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTA

**SD** (Shine-Dalgarno): GAAGGAGATAGA

**K** (Kozak): ACC

**M** (metionina): ATG; códon de iniciação

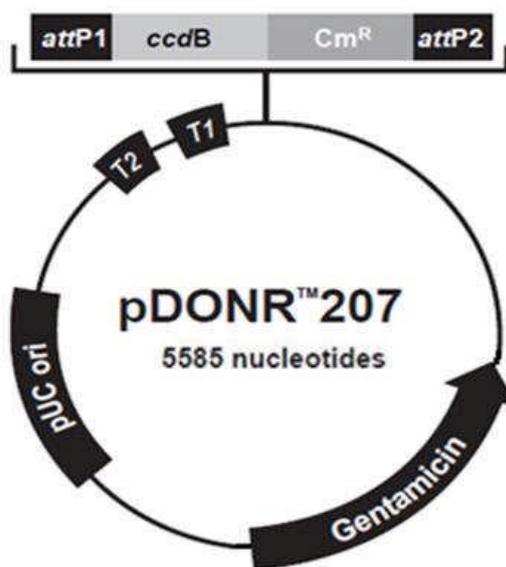
\*: TTA; códon de parada

As sínteses dos cDNAs foram realizadas utilizando a enzima transcriptase reversa *Super Script IV* (Invitrogen) (anexo I-8). A partir disso, os genes em questão foram amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando-se *Phusion® High Fidelity Taq DNA Polymerase* (NEB) (anexo I-14). Os fragmentos foram aplicados em gel de agarose (AMRESCO®) 1%, submetidos à eletroforese, analisados no programa *GeneSyn* e então, os fragmentos com os tamanhos esperados foram extraídos do gel e purificados seguindo

instruções do kit comercial GFX PCR DNA and *Gel Band Purification* (GE Healthcare) (anexo I-4) para posteriormente serem clonados no vetor de entrada pDONR207.

### 5.2.2 Clonagem dos genes no vetor de entrada pDONR207 para reação de recombinação da BP Clonase

A reação de recombinação da BP Clonase constituiu-se de: 1,5 µl do att-PCR, 1,5 µl do vetor pDONR207 (figura 5.3), 1 µl de H<sub>2</sub>O estéril e 1 µl do mix *BP Clonase Gateway* (Invitrogen). A reação ficou por toda a noite à temperatura ambiente e após isso, foram adicionados 2 µl de proteinase K (2 µg/µl) e incubada a 37 °C por 10 minutos antes da transformação em células competentes de *E. coli* estirpe DH10β (anexo I-6 e anexo I-7). Colônias isoladas obtidas em placas de Petri com meio LB-Ágar contendo canamicina, foram utilizadas para extração de DNA plasmidial usando o *kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) (anexo I-11). O DNA foi submetido ao sequenciamento via Sanger para confirmação da integridade dos fragmentos clonados.



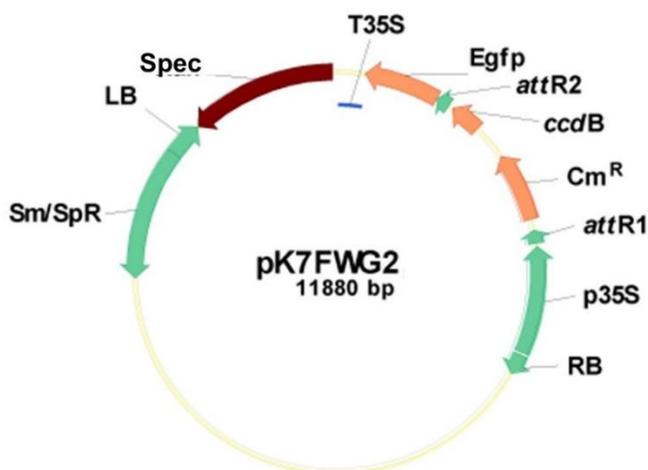
**Figura 5.3:** Representação esquemática do vetor de entrada pDONR207 que possui 5.585pb. É possível ver a presença dos sítios *attPs* que são locais de recombinação específicos e que permitem a recombinação com o vetor de destino, a presença do gene cassette (*ccdB*) que codifica uma proteína letal para a bactéria e uma marca de seleção por antibiótico que é a gentamicina. Esse vetor foi usado para recombinar os genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP a partir do Sistema Gateway (Disponível em: Sgamma, 2010).

### 5.2.3 Clonagem dos recombinantes em pDONR207 nos vetores de destino pK7FWG2 e pK7WGF2 para reação de recombinação da LR Clonase

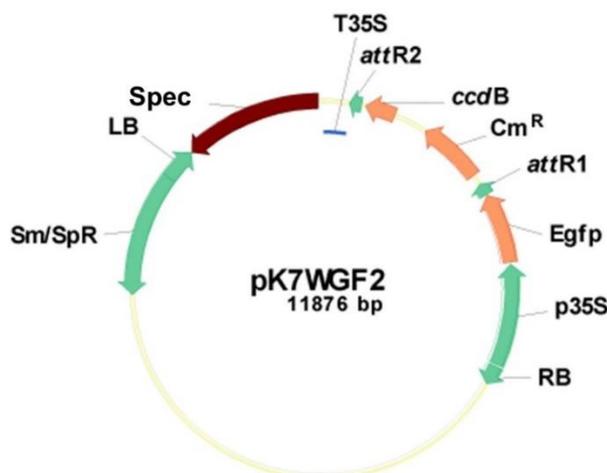
Foram desenhados iniciadores para as regiões tanto N-terminal quanto C-terminal dos genes alvos. A reação de recombinação da LR Clonase constituiu-se de: 1,5 µl do plasmídeo

resultante da reação anterior de BP Clonase, 1,5 µl do vetor de destino, pK7FWG2 (figura 5.4) ou pK7WGF2 (figura 5.5), 1 µl de H<sub>2</sub>O estéril e 1 µl do mix *LR Clonase Gateway* (Invitrogen). A reação ficou por toda a noite à 25°C.

Após isso, foram adicionados 2 µl de proteinase K (2 µg/µl), e a reação foi incubada a 37 °C por 10 minutos antes da transformação e clonagem (anexo I-6) em células competentes de *E. coli* estirpe DH10β (anexo I-7). Colônias isoladas obtidas em placas de Petri com meio LB-Ágar contendo espectinomicina, foram utilizadas para extração de DNA plasmidial usando o *kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)* seguindo as instruções do fabricante (anexo I-11). O DNA foi submetido ao sequenciamento via Sanger para confirmação dos fragmentos.



**Figura 5.4:** Representação esquemática do vetor de destino pK7FWG2 que possui 11.880pb. Esse vetor foi usado para recombinar os genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP. É possível observar os sítios de recombinação *attRs* e uma marca de seleção para o antibiótico espectinomicina (Adaptado- Disponível em: Sze, 2010).



**Figura 5.5:** Representação esquemática do vetor de destino pK7WGF2 que possui 11.876pb. Esse vetor foi usado para recombinar os genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP. É possível observar os sítios de recombinação *attRs* e uma marca de seleção para o antibiótico espectinomicina (Adaptado- Disponível em: Sze, 2010).

#### **5.2.4 Transformação dos recombinantes em *A. tumefaciens* e agroinfiltração em *N. benthamiana***

As construções obtidas foram transformadas e clonadas (anexo I-16) em células competentes (anexo I-15) de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 por eletroporação seguindo a metodologia já estabelecida pela literatura. As construções foram induzidas e a solução final de cada amostra foi diluída até obter-se uma densidade ótima (OD de 600 nm) 2, para que pudesse ser preparada para agroinfiltração (anexo I-17). As plantas de *Nicotiana benthamiana* foram agroinfiltradas e mantidas no *fitotron* por 4 dias. Para cada proteína expressa, foi utilizada uma planta onde 4 folhas de cada planta foram agroinfiltradas.

#### **5.2.5 Localização citoplasmática das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP em microscopia confocal**

As plantas agroinfiltradas tiveram suas folhas observadas ao microscópio confocal quatro dias após a realização da agroinfiltração utilizando o equipamento Leica TCS SP2 com os lasers de Argônio e Hélio-Neônio. A proteína eGFP foi excitada a 488 nm e a luz capturada entre 525-550. Posteriormente, as imagens foram geradas utilizando o programa Leica LCS.

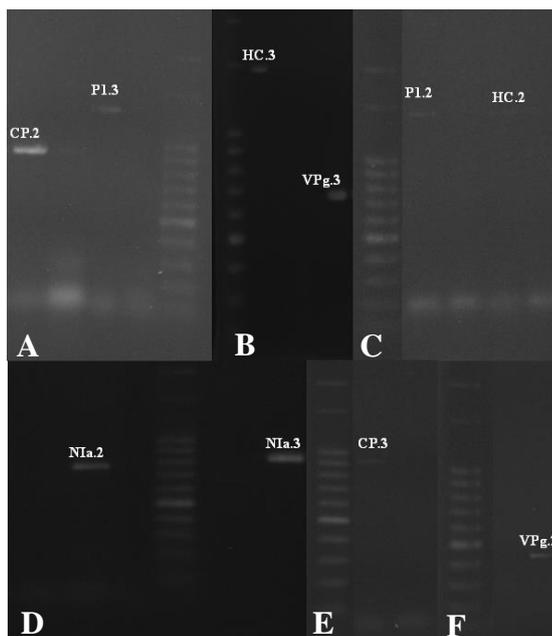
### **5.3 RESULTADOS**

As proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP foram escolhidas para a construção de vetores que serão usados em estudos de interação proteína-proteína durante o processo de infecção viral de *Stylomyovirus* (StyMaV-2) e *Roymovirus* (StyYMV). Tais proteínas foram selecionadas por estarem envolvidas com as diversas funções que ocorrem durante o ciclo de infecção, além de três delas serem proteases (P1-Pro, HC-Pro e NIa-Pro) responsáveis pela clivagem da poliproteína codificada pelos vírus.

Essas variadas funções foram identificadas para outros potyvirus em diferentes plantas hospedeiras e são responsáveis pela: sintomatologia, infectividade e acúmulo viral (P1-Pro); supressão do silenciamento, movimento sistêmico e transmissão do vetor (HC-Pro); iniciação da replicação ao interagir com os fatores de tradução da hospedeira (VPg), interação proteína-proteína (NIa-Pro), interação com o vetor, movimento célula-a-célula, amplificação e encapsidação do genoma (CP).

### 5.3.1 Amplificação dos genes P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV por RT-PCR para os ensaios de recombinação

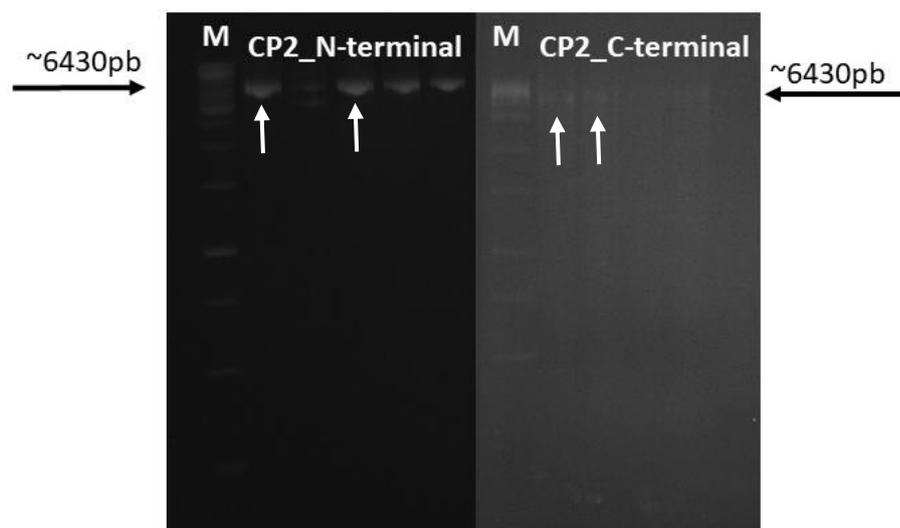
Após a PCR, os fragmentos CP.2 (900 pb), P1-Pro.3 (1,3 pb) (Figura 5.6A); HC.3 (1,4 pb), VPg.3 (650 pb) (Figura 5.6B); P1-Pro.2 (1,3 pb), HC.2 (1,3 pb) (Figura 5.6C); NIa.2 (850 pb), NIa.3 (850 pb) (Figura 5.6D); CP.3 (950 pb) (Figura 5.6E); e VPg.2 (450 pb) (Figura 5.6F) correspondentes aos genes dos vírus StyMaV-2 e StyYMV foram obtidos.



**Figura 5.6: Resultado da amplificação dos genes selecionados por RT-PCR usando *OlidodT* e iniciadores específicos como mostrado nos géis A, B, C, D, E e F. Os genes P1-Pro.2, HC.2, VPg, NIa.2 e CP.2 pertencem ao StyMaV-2 e os genes P1-Pro.3, HC.3, VPg.3, NIa.3, e CP.3 pertencem ao StyYMV. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% usando o marcador de 100 pb da *Ludwig*.**

### 5.3.2 Análise da clonagem dos genes no vetor de entrada pDONR207 para reação de recombinação da BP Clonase

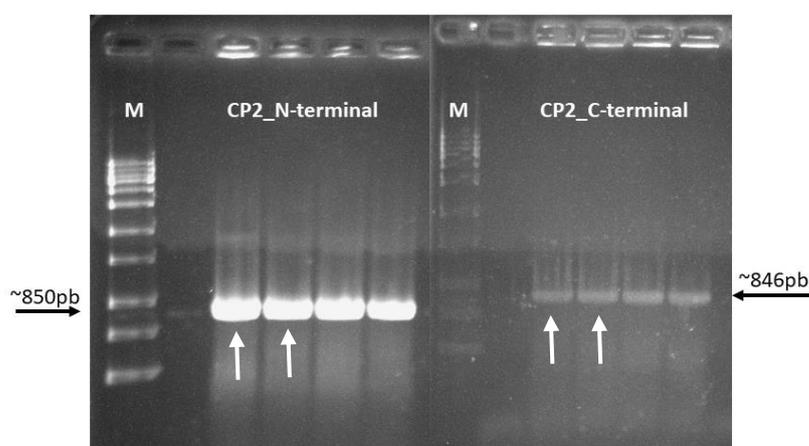
Os fragmentos amplificados foram recombinados no vetor de entrada pDONR207 (5882 pb) através da reação de BP Clonase do Sistema Gateway. Foram selecionadas cinco colônias de cada amostra e confirmadas por PCR de colônia usando *Taq Platinum DNA Polymerase* (anexo I-3). Após a BP Clonase, os vetores pDONR207 recombinantes (figura 5.7) foram confirmados por sequenciamento.



**Figura 5.7:** Resultado da extração de DNA plasmidial em gel de agarose 1% da PCR de cinco colônias selecionadas do gene da CP do vírus StyMaV-2 com o GFP fusionado nas regiões N e C- terminais dessas proteínas. CP (~850 pb) recombinada em vetor pDONR207 (5585 pb) totalizando um fragmento de ~6430 pb. A seta branca indica as colônias que foram selecionadas para sequenciamento. Foi feito o mesmo com as demais proteínas, sendo escolhida a CP do vírus StyMaV-2 como exemplo do que foi realizado.

### 5.3.3 Análise da clonagem dos recombinantes em pDONR207 nos vetores de destino pK7FWG2 e pK7WGF2 para reação de recombinação da LR Clonase

Após a confirmação dos recombinantes por sequenciamento eles foram novamente recombinados, agora nos vetores de destino pK7FWG2 e pK7WGF2 através da reação de LR Clonase do Sistema Gateway. Foram selecionadas cinco colônias de cada amostra e confirmadas por PCR de colônia usando *Taq Platinum DNA Polymerase* (anexo I- 3) segundo as recomendações do fabricante (figura 5.8). Após a BP Clonase, os vetores pDONR207 recombinantes foram confirmados por sequenciamento via Sanger.



**Figura 5.8:** Resultado da PCR de colônia em gel de agarose 1% da PCR (usando oligonucleotídeos específicos com consta na tabela 5.1) de cinco colônias selecionadas do gene da CP do vírus StyMaV-2 com o GFP fusionado nas regiões N e C- terminais dessas proteínas. As setas brancas indicam as colônias que foram selecionadas. Foi

feito o mesmo com as demais proteínas, sendo escolhida a CP do vírus StyMaV-2 como exemplo do que foi realizado.

#### **5.3.4 Transformação dos recombinantes em *A. tumefaciens* e agroinfiltração em *N. benthamiana***

As proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos stylovirus StyMaV-2 (Stylomovirus) e StyYMV (*Roymovirus*), foram utilizadas para determinar a localização subcelular em tecidos de *N. benthamiana* anteriormente agroinfiltrados. Essas proteínas que são multifuncionais, estão relacionadas com diversas funções como: supressão do silenciamento, movimento sistêmico, transmissão do vetor, interação com fatores de tradução da hospedeira, interação proteína-proteína, movimento célula-a-célula, amplificação e encapsidação do genoma, dentro do processo de infecção na célula vegetal.

Esses genes candidatos das proteínas virais foram então fusionados nas extremidades N e C-terminais de eGFP, correspondendo na fusão da extremidade carboxil (C-Terminal) e amino (N-terminal), respectivamente, de cada fusão proteica obtida. As construções gênicas foram transferidas para *A. tumefaciens* visando a agroinoculação em folhas de *N. benthamiana*, permitindo dessa maneira a expressão transiente das proteínas virais em estudo. Quatro dias após a agroinfiltração, foi possível observar fluorescência das construções em microscopia confocal.

#### **5.3.5 Localização citoplasmática das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP em microscopia confocal**

Por meio de expressão transiente e quatro dias após a agroinfiltração dos vetores de expressão em plantas de *N. benthamiana*, foi possível observar por fluorescência a localização citoplasmática das proteínas P1-Pro (figura 5.9-B), HC-Pro (figura 5.9-C), VPg (figura 5.9-D), NIa-Pro (figura 5.9-E) e CP (figura 5.9-F) StyMaV-2 e StyYMV para confirmar a integridade das construções obtidas. Uma folha de *N. benthamiana* transgênica que possui fluorescência por GFP foi usada como controle (figura 5.9A).

Foi observado o acúmulo dessas proteínas no citoplasma da célula. Todas as construções dos vetores de expressão produzidas neste trabalho demonstraram ser competentes para a realização dos estudos propostos. As proteínas HC-Pro, VPg e NIa-Pro tendem a formar vesículas que se ancoram às membranas do retículo endoplasmático formando um complexo replicativo. Já as proteínas P1-Pro e CP, participam do movimento célula-a-célula facilitado pelo aumentando dos limites de exclusão do plasmodesma.

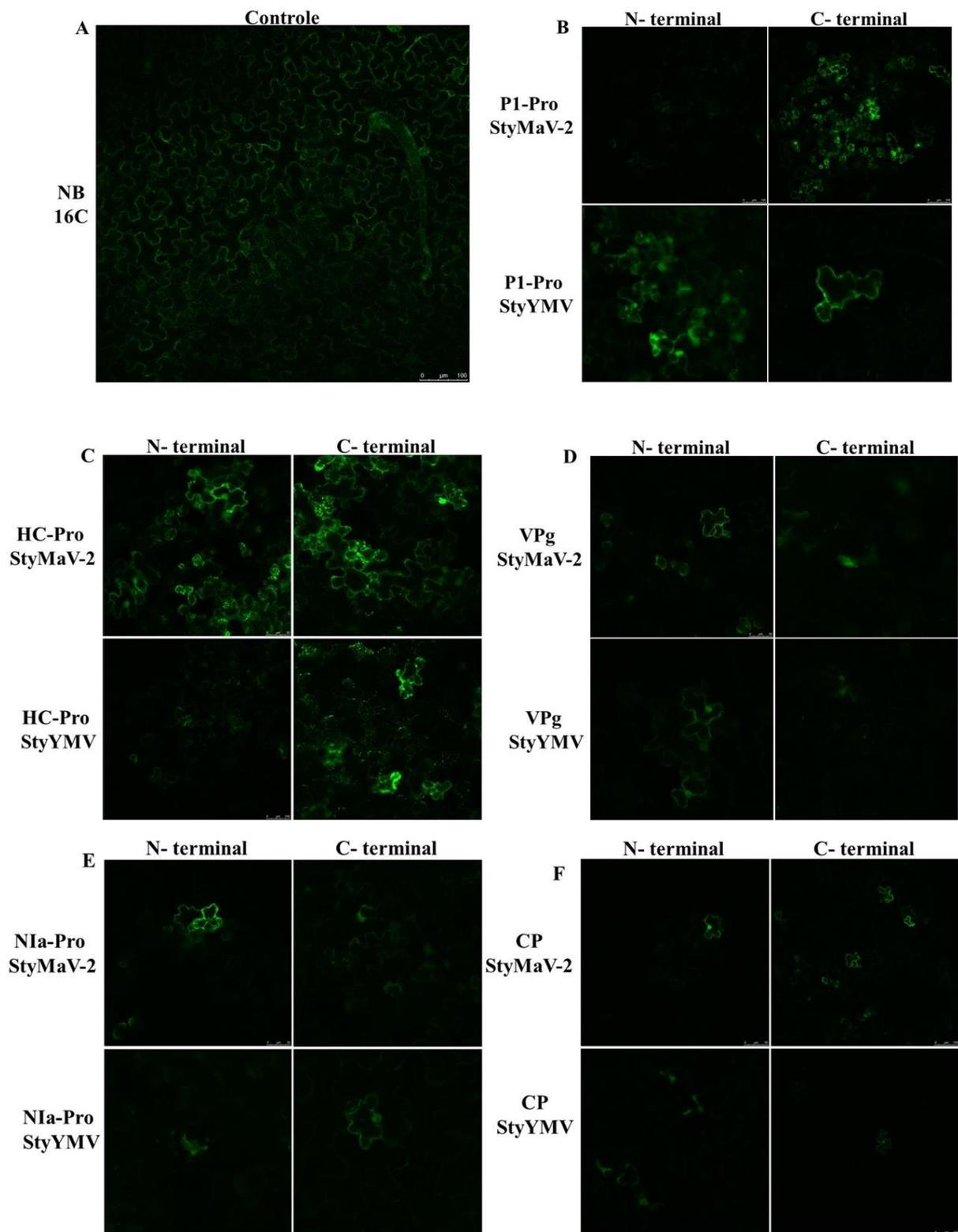
É possível notar que a proteína P1-Pro do StyYMV na fusão N-terminal da proteína fluorescente, apresentou um sinal de expressão maior do que na fusão C-terminal desse mesmo vírus. Quanto ao StyMaV-2, a expressão foi maior na fusão C-terminal para essa mesma proteína (figura 5.9-B). A proteína P1 dos potyvirus está relacionada com a infectividade, sintomatologia, interage com fatores da hospedeira e, pode estar relacionada com supressão do silenciamento gênico.

No caso da proteína HC-Pro, o sinal de expressão da fusão dessa proteína, no caso do StyMaV-2, nas regiões N e C- terminais do GFP foi semelhante e maior quando comparada ao StyYMV. Com relação às fusões N e C-terminais do StyYMV. a expressão maior foi na fusão C-terminal (figura 5.9-C). A proteína HC-Pro dos potyvirus está relacionada com a interação vírus/vetor e com a atividade de supressão do silenciamento gênico. Geralmente, as proteínas supressoras são mais expressas e a intensidade da fluorescência é maior.

A proteína VPg fusionada na região N-terminal do GFP, tanto do StyMaV-2 quanto do StyYMV, tiveram uma expressão maior do que na região C-terminal (figura 5.9-D). A proteína VPg dos potyvirus é precursora do processo de replicação e interage com fatores de tradução da hospedeira. Sua localização celular apresenta-se difusa no citoplasma, como foi observado para ambos os vírus e como o esperado dentro da família.

Na fusão da proteína NIa-Pro do StyMaV-2 na região N-terminal do GFP a expressão foi maior do que na fusão C-terminal. No caso do StyYMV, foi o contrário, sendo maior a expressão na região C-terminal do que na região N-terminal (figura 5.9-E). A NIa-Pro é uma proteína que interage tanto com as proteínas da hospedeira formando inclusões nucleares, quanto com as proteínas virais na formação de complexos replicativos, além de ser uma protease.

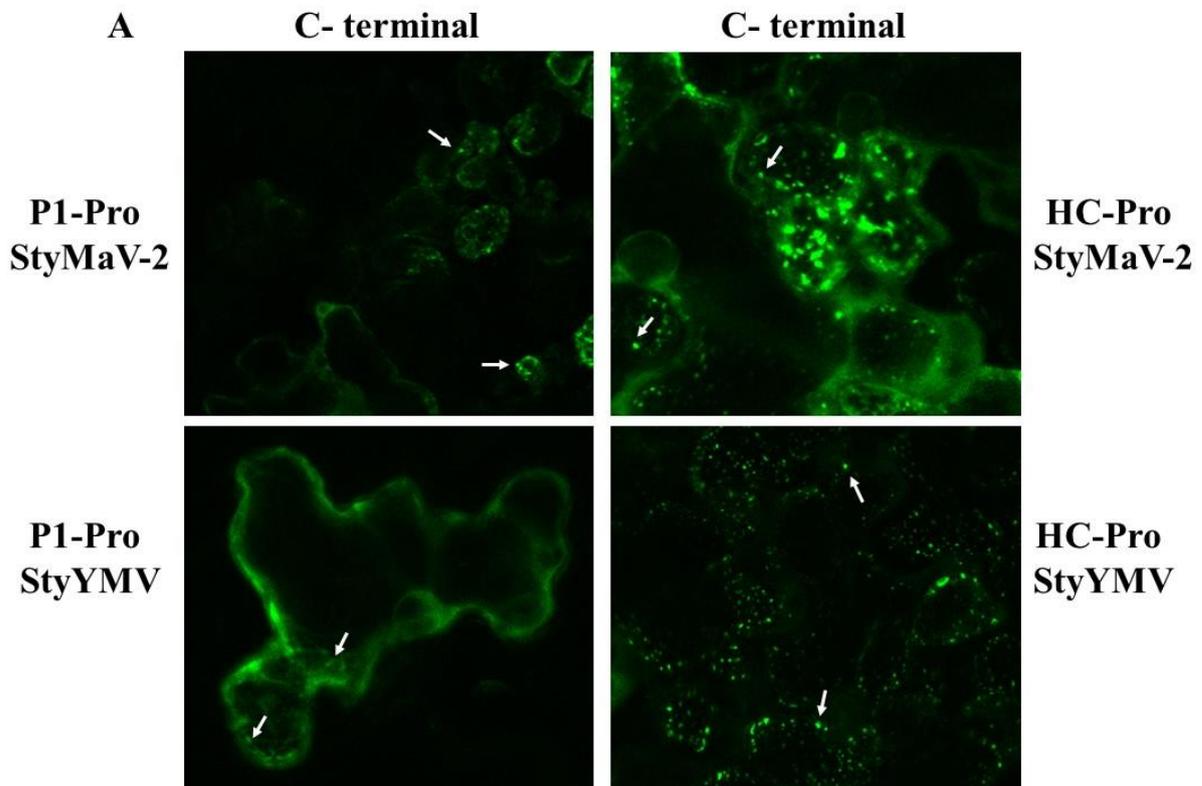
Por fim, a proteína CP do StyMaV-2 fusionada na região N e C terminais da proteína GFP, apresentou um sinal de expressão maior do que do StyYMV nas fusões N e C terminais da proteína fluorescente (figura 5.9-F). A CP está envolvida com diversas funções dentro do ciclo de infecção viral. É uma proteína que interage com outras proteínas virais durante a formação do complexo replicativo, interage com o vetor de transmissão, é responsável por proteger o RNA genômico e é responsável principalmente com o movimento viral.

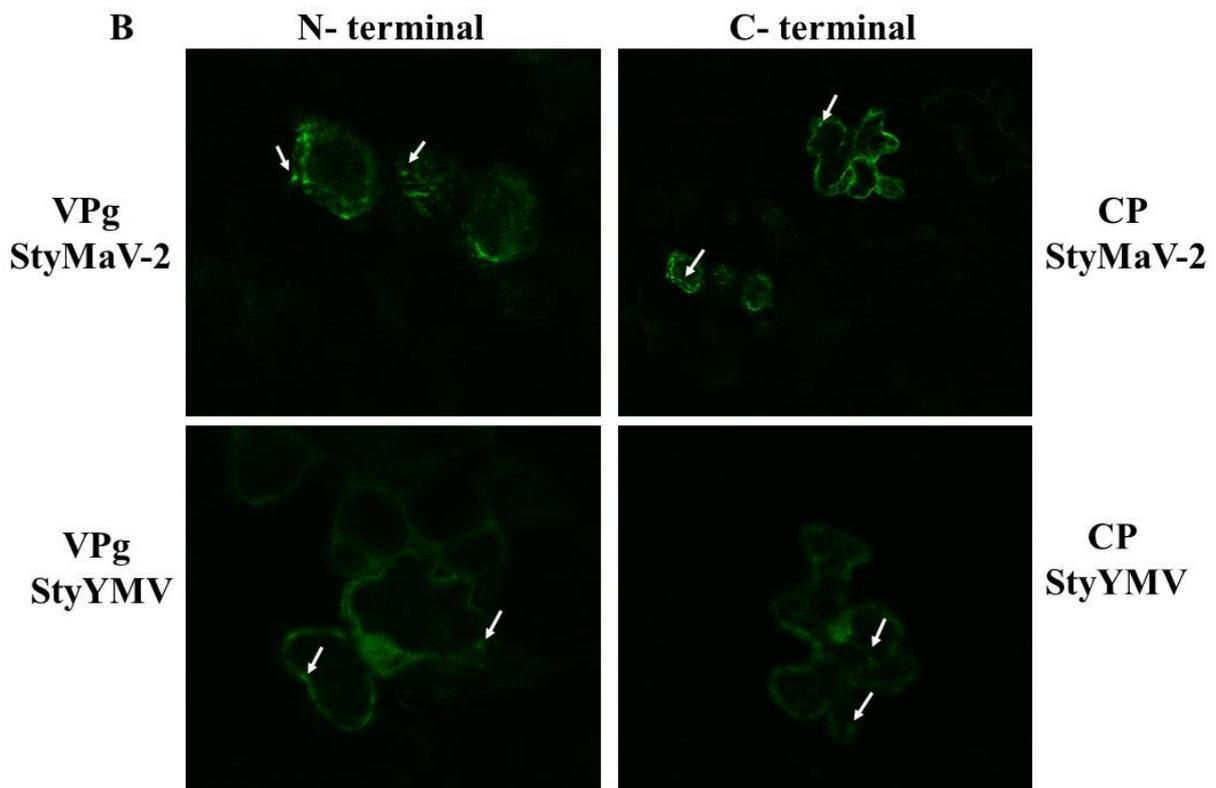


**Figura 5.9:** Visualização em microscópio confocal Leica TCS SP2 da expressão transiente das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV, fusionadas com eGFP, nas regiões N e C terminais das proteínas alvo, e agroinfiltradas em folhas de *N. benthamiana* 4 dpa. A) Controle: planta transgênica de *N. benthamiana* (NB 16C) – GFP emitindo fluorescência. B) P1-Pro com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. C) HC-Pro com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. D) VPg com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. E) NIa-Pro com GFP fusionado nas regiões N e

C da proteína para os dois vírus. F) CP com GFP fusionado nas regiões N e C da proteína para os dois vírus. Barra de 100  $\mu$ m.

A presença de pequenos grânulos no citoplasma de tamanhos similares, foi observada nas fusões das proteínas P1-Pro, HC-Pro e CP na região C-terminal da proteína fluorescente e na fusão da proteína VPg na região N-terminal (figura 5.10). Essas observações sugerem uma possível associação destas proteínas com o plasmodesma, já que a formação de grânulos é típica de proteínas de movimento. As proteínas P1-Pro e HC-Pro, além de estarem relacionadas com a supressão do silenciamento gênico, participam do movimento célula-célula, juntamente com a VPg e outras proteínas como a CI e a PIPO. Essas informações são coerentes com as que já constam na literatura.





**Figura 5.10:** Visualização de fluorescência em microscopia confocal da expressão transitória em folhas de *Nicotiana benthamiana* das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg e CP dos vírus StyMaV-2 e StyYMV fusionadas com GFP 4 dias após a agroinfiltração. Presença de grânulos no citoplasma (seta branca) da localização das proteínas P1-Pro e HC-Pro fusionadas na região C-terminal da proteína GFP (A), VPg fusionada na região N-terminal da proteína fluorescente (B) e CP fusionada na região C-terminal do GFP (B), para ambos os vírus.

## 5.4 DISCUSSÃO

As proteínas de potyvirus são multifuncionais e desenvolvem diversas funções e atividades dentro do ciclo de infecção viral, interagindo entre elas mesmas, com proteínas da hospedeira e com proteínas do vetor de transmissão (Adams *et al.*, 2012). Os membros da família *Potyviridae* possuem em média dez proteínas multifuncionais, sendo que três delas são proteases que auxiliam na clivagem da poliproteína em sítios de reconhecimento específicos (Wylie *et al.*, 2017). Alguns gêneros possuem as três proteases como *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Poacevirus* e a espécie tipo do gênero *Ipomovirus* (Revers & García *et al.*, 2015).

Outros gêneros como *Macluravirus*, *Bevemovirus*, *Areparavirus*, *Celavirus* e alguns membros do gênero *Impomovirus* possuem apenas as proteases HC-Pro e NIa-Pro (Revers & García *et al.*, 2015). Por fim, os *Bymovirus* possuem apenas a NIa-Pro responsável pela clivagem do RNA 1 e a P1-Pro responsável pela clivagem do RNA 2 liberando a proteína P2 (Adams *et al.*, 2012; You & Shirak, 2010). Os membros do gênero *Stylomovirus* (StyMaV-1 e

StyMaV-2) proposto por esse grupo de pesquisa, e a nova espécie dentro do gênero *Roymovirus* (StyYMV), possuem as três proteases (de Souza *et al.*, 2021).

A protease P1-Pro tem papel crucial com fatores de interação na hospedeira nos domínios N e C terminais (Shan *et al.*, 2018). Além disso, apresenta funções relacionadas com a replicação viral, supressão do silenciamento gênico, movimento viral e transmissão (Rohosková & Navrátil, 2011). A HC-Pro é um componente auxiliar na transmissão por afídeos, está relacionada também com o movimento viral, a supressão do silenciamento gênico, interage com proteínas da hospedeira e com outras proteínas virais como a P1, VPg e CP (Valli *et al.*, 2018; Ivanov *et al.*, 2016; Del Toro *et al.*, 2014; Rohosková & Navrátil 2011; Ala-Poikela *et al.*, 2011; Ziliam *et al.*, 2011).

A proteína NIa-Pro possui um domínio nuclease responsável pela clivagem em sete sítios específicos da poliproteína, além de interagir com proteínas da hospedeira e formar inclusões nucleares durante esse processo (Sun *et al.*, 2010). A proteína VPg interage com proteínas virais e participa do processo de tradução interagindo com fatores eIF4E da hospedeira (Elena & Rodrigo, 2012). Encontra-se envolvida no processo de replicação, exerce atividade de supressão do silenciamento gênico, é responsável por movimentos à curta e à longa distância (Revers & García, 2015; Cheng & Wang, 2017).

Por fim, a proteína CP é a mais abundante, pois é responsável pela encapsidação do genoma viral, possui outras funções também como: amplificação, movimento e transmissão (Adams *et al.*, 2012). A escolha dessas cinco proteínas multifuncionais (P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP) na construção de vetores para estudos da interação de proteínas no processo de infecção entre StyMaV-2 (Stylomovirus) e StyYMV (*Roymovirus*) tem como objetivo entender quais as relações que esses vírus possuem e as funções que exercem durante o processo de infecção mista na hospedeira.

Entender essas relações é necessário pois trazem informações importantes que abrem caminhos para outros estudos que culminam no desenvolvimento de tecnologias principalmente para área de melhoramento genético para controle das infecções virais. Os vírus vegetais codificam pelo menos uma proteína com atividade de supressão de silenciamento gênico (Csorba *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). No caso dos potyvirus, eles não conseguem iniciar o ciclo de infecção sem a presença de uma proteína supressora. Esses resultados mostraram a importância de conhecer quais dessas proteínas podem estar envolvidas com essa atividade.

Todas as construções dos vetores de expressão produzidas neste trabalho demonstraram ser competentes para a realização dos estudos propostos. Por meio de expressão transiente após

quatro dias pós agroinfiltração dos vetores de expressão em plantas de *N. benthamiana*, foi possível observar por fluorescência a localização citoplasmática das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus testados StyMaV-2 e StyYMV. Dessa forma, esses vetores poderão ser usados nos experimentos subsequentes visando o estudo das funções das proteínas virais e potenciais interações com proteínas de plantas hospedeiras, inferindo com base nas localizações subcelulares.

Por se tratar de um processo de interação entre proteínas de um novo gênero (Stylomovirus), que está sendo proposto por nosso grupo de pesquisa, e um outro gênero ainda pouco estudado (*Roymovirus*), outras funções podem estar relacionadas com essas proteínas e que são importantes para o ciclo de infecção, ou para corroborar os dados já presentes na literatura. A produção de clones infecciosos dos stylomovirus permitirá entender melhor quais são os mecanismos que esses vírus utilizam para causar infecções, podendo elucidar até mesmo outras espécies com características genômicas semelhantes como o *Blackberry virus Y* (*Brambyvirus*) e *Rose yellow mosaic virus* (*Roymovirus*).

De toda forma, a caracterização biológica e molecular de novos vírus, como estudos de sinergismo e/ou antagonismo e recombinação dos stylomovirus a partir de deleções, mutações e co-infecção controlada *in vivo* usando gene repórter, assim como, os avanços nos estudos de interação stylomovirus-hospedeira através da sub-localização celular de proteínas virais em ensaios de expressão transiente *in vivo* usando marcadores de organelas com gene repórter RFP ao microscópio confocal, faz-se necessária, visando a proposição de medidas de controle eficientes, além de trazer novas perspectivas no estudo dos processos infectivos desses novos vírus.

## 5.5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram construídos vetores para estudo da interação de proteínas no processo de infecção de dois vírus de estiloides (StyMaV-2 e StyYMV). Foram selecionadas cinco proteínas de cada um dos vírus (P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP) que são multifuncionais, estando envolvidas em diversas atividades do ciclo de infecção viral na hospedeira. As proteínas selecionadas foram fusionadas nas regiões N e C terminais de uma proteína fluorescente (GFP) para localização subcelular em microscopia confocal por expressão transiente a partir de folhas de *N. benthamiana* previamente agroinfiltradas. Todas as construções dos vetores de expressão produzidas neste trabalho demonstraram ser competentes para a realização dos estudos propostos. Estudos futuros deverão ser realizados para elucidar a

função dessas proteínas durante o ciclo de infecção e as relações vírus/hospedeiro existentes durante infecções mistas entre os gêneros *Stylomovirus* e *Roymovirus*.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; ZERBINI, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. Family *Potyviridae*. In: KING, M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. Virus Taxonomy. Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Virus (2012). Elsevier Academic Press, London, 1069-1089p.

ALA-POIKELA, M.; GOYTIA, E.; HAIKONEN, T.; RAJAMAKI, M. L.; VALKONEN, J. T. Helper componente proteinase of genus Potyvirus is na interaction partner of translation initiation fator eIF(iso)4E and eIF4E that contains a 4E binding motif (2011). Journal of Virology, 85: 6784-6794p. DOI: <https://doi.org/JVI.00485-11>

CHENG, X. & WANG, A. The potyvirus silencing supressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autoghagy pathways (2017). Journal Virology, 90(1): e01478-16, 1-16p. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01478-16>

CHEVRAY, P. M. & NATHANS, D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun (1992). Proc. Natl. Acad. Sci., 89(13): 5789-5793p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5789>

de SOUZA, J. M.; FRAGOSO, K. N. S.; ORÍLIO, A. F.; MELO, F. L.; NAGATA, T.; FERNANDES, C. D.; VALÉRIO, J. R.; TORRES, F. Z. V.; AMARAL, B. B.; PEREIRA, T. B. C.; OLIVEIRA, A. S.; RESENDE, R. O. Two viroses from *Stylosanthes guianensis* may represent a new genus within *Potyviridae* (2021). Virus Research, 293: 198257, 1-12p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198257>

DEL-TORO, F.; FERNÁNDEZ, F. T.; TILSNER, J.; WRIGHT, K. M.; TENLLADO, F.; CHUNG, B. N.; PRAVEEN, S.; CANTO, T. Potato virus Y HC-Pro localization at distinct, dynamically related and environment-influenced structures in the cell cytoplasm (2014). Molecular Plant Microbe, 27(12): 1331-1343p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1084/MPMI-05-14-0155-R>

ELENA, S. F. & RODRIGO, G. Towards an integrated molecular modelo of plant-virus interactions (2012). Current Opinion in Virology, 2: 719-724p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conviro.2012.09.004>

FAGGIONATO, D. Suppressors of developmental myogenesis defects resulting in Duchenne muscular dystrophy, genes and mechanisms (2010). University of Freiburg, Laboratory for Bioinformatics and Molecular Genetics (Dissertation), 56p.

FIELDS, S. & SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions (1989). Nature, 346: 245-246p. DOI: <https://doi.org/10.1038/340245a0>

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids (1983). J. Mol. Biol., 166: 557-580 p. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)

INOUE, H., NOJIMA, H. e OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids (1990). Gene, 96: 23-28 p. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1110\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1110(90)90336-p)

IVANOV, K. I.; ESKELIN, K.; BASIC, M.; DE, S.; LOHMUS, A.; VARJOSALO, M.; MAKINEN, K. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HC-Pro (2016). The Plant Journal, 85: 30-45p. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.13088>

KARIMI, M., DEPICKER, A., E PIERRE HILSON, P. Recombinational cloning with plant Gateway Vectors (2007). Plant Physiology, 145: 1144–1154 p. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.106989>

MINSKY, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope (1988). Scanning, 10: 128-138p. DOI: <https://doi.org/10.1002/sca.495-0100403>

REVERS, F. & GARCIA, J. A. Molecular biology of potyviruses (2015). Advances in virus research, 92(3): 101-199p. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>

ROHOZKOVÁ, J., NAVRÁTIL, M. P1 peptidase – a mysterious protein of family *Potyviridae* (2011). Journal of Biosciences 36: 189-200p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9020-6>

SAMBROOK, J & RUSSEL, D. W. Molecular Cloning: a laboratory manual (2000). CSHL PRESS, 3<sup>a</sup> ed, v 1. Protocol 17: Directional cloning into plasmid vectors. Chapter 1: Plasmids and their usefulness in Molecular Cloning, 1.84-1.87p.

SGAMMA, T. Regulation of juvenility in *Artirrhinum majus* (2012). University of Warwick, School of Life Sciences, Plant and Environmental Sciences (PhD), 88p.

SHAN, H.; PASIN, F.; TZANETAKIS, I. E.; SIMÓN-MATEO, C.; GARCIA, J. A.; RODAMILANS, B. Truncation of a P1 leader proteinase facilitates potyvirus replication in a non-permissive host (2018). Molecular Plant Pathology, 19(6): 1504-1510p. DOI: <https://10.1111/mpp.12640>

SUN, P.; AUSTIN, B. P.; TOZSÉR, J.; WAUGH, D. S. Structural determinants of tobacco vein mottling virus protease substrate specificity (2010). Protein Science, 19: 2240-2251p. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.506>

SZE, H. Discovering transporters for essential minerals and toxic ions in plants (2010). University of Maryland, Department of Cell Biology & Molecular Genetics. Disponível em: [https://science.umd.edu/CBMG/faculty/sze/lab/CHX/RES/gfp/chx\\_gfp.html](https://science.umd.edu/CBMG/faculty/sze/lab/CHX/RES/gfp/chx_gfp.html)

VALLI, A. A.; GALLO, A.; RODAMILANS, B.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. The HC-Pro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking helper component that every virus would like to have (2018). *Molecular Plant Pathology*, 19(3): 744-763p. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12553>

WYLIE, S. J., ADAMS, M., CHALAM, C., KREUZE, J., LOPEZ-MOYA, J. J., OHSHIMA, K., PRAVEEN, S., RABENSTEIN, F., STENGER, D., WANG, A.; ZERBINI, F. M. ICTV virus taxonomy profile: *Potyviridae* (2017). *Journal General Virology*, 98: 352–354p. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740>

YOU, Y & SHIRAK, Y. *Bymovirus* reverse genetics: requirements for RNA-2 encoded proteins in systemic infection (2010). *Molecular Plant Pathology*, 11(3): 383-394p. DOI: <https://10.1111/J.1364-3703.2010.00613.X>

ZILIAN, E. & MAISS, E. Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions in plant using an optimized MRFP-based bimolecular fluorescence complementation system (2011). *Journal of General Virology*, 92(Pt12): 2711-2723p. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.033811-0>

## CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O uso de *Stylosanthes* spp. (leguminosa) têm aumentado no Brasil devido ao seu valor nutricional e por apresentar grande potencial na fixação de nitrogênio. Nos últimos anos, sintomas de mosaico semelhantes àqueles causados por infecções virais foram observados no campo, indicando que esta leguminosa forrageira pode ser suscetível a esses patógenos. Resultados obtidos pelo sequenciamento nessas amostras sintomáticas de estilosantes oriundas do campo experimental da Embrapa Gado de Corte via HTS, mostraram a presença de três novos vírus pertencentes à família *Potyviridae*.

Simultaneamente, foi feita a montagem dos *contigs* e então, desenvolvidas ferramentas de detecção por RT-PCR a partir das sequências consenso obtidas via HTS. Essas análises demonstraram que estes vírus representam novas espécies dentro da família e foram tentativamente nomeados como “*Stylosanthes* mosaic-associated virus 1” (StyMaV-1), “*Stylosanthes* mosaic-associated virus 2” (StyMaV-2) e “*Stylosanthes* yellow mosaic virus” (StyYMV). Baseado no critério taxonômico de demarcação de espécies os vírus StyMaV-1 e StyMaV-2 pertencem a um novo gênero dentro da família *Potyviridae* (tentativamente denominado “*Stylomovirus*”) e o StyYMV encontra-se dentro de um gênero já existente (*Roymovirus*).

Além da caracterização molecular e análise filogenética, os resultados alcançados até o presente, demonstraram que os novos vírus caracterizados são transmitidos por mosca branca (MEAM 1). Esses resultados trouxeram informações científicas inéditas como a comprovação que o novo gênero proposto (tentativamente denominado “*Stylomovirus*”) composto pelas espécies StyMaV-1 e StyMaV-2 são transmitidos por moscas brancas. Este fato agrega mais um gênero pertencente à família *Potyviridae* transmitidos por esses insetos, juntamente com os *Ipomovirus*. Os resultados demonstram também, que o StyYMV pertencente a um gênero já existente (*Roymovirus*), pode ser transmitido por mosca branca.

Até o presente, a espécie tipo do gênero *Roymovirus*, o *Rose yellow mosaic virus* (RoYMV), não possui vetor identificado. Esses resultados, ajudam a propor medidas de controle preventivas, a realizar o manejo adequado de estilosantes em campo e a entender as relações existentes dentro desse patossistema. Outros vetores como cigarrinhas e afídeos podem também estar envolvidos nesse ciclo de transmissão, já que são, também bem abundantes em campos experimentais, sendo vistos em plantas sintomáticas. No estudo das interações entre proteínas virais e proteínas do hospedeiro, todas as construções dos vetores de expressão

produzidas neste trabalho demonstraram ser competentes para a realização dos estudos propostos.

Por meio de expressão transiente após agroinfiltração dos vetores de expressão em plantas de *N. benthamiana*, foi possível observar por fluorescência a localização citoplasmática das proteínas P1-Pro, HC-Pro, VPg, NIa-Pro e CP dos vírus testados StyMaV-2 e StyYMV. Dessa forma, esses vetores poderão ser usados nos experimentos subseqüentes visando o estudo das funções das proteínas virais e potenciais interações com proteínas de plantas hospedeiras. Assim como, os vetores construídos para expressão heteróloga, poderão ser usados para a produção de antissoros policlonais que poderão ser usados como imunomarcadores em microscopia ótica e eletrônica para estudos de interação vírus-vetor.

Os danos que os styloviruses podem causar para estilosantes não foram calculados, porém, estima-se que essas co-infecções podem sim causar prejuízos na produção de proteína já que infecções virais podem dificultar na absorção de fotoassimilados. Sendo assim, esses prejuízos refletem na conversão de proteína vegetal e conseqüentemente na qualidade do produto final, que no caso é a proteína animal. A presença desses vírus também pode prejudicar o mercado de sementes, ameaçando a fitossanidade e também causando perdas de diversidade. Estudos epidemiológicos desses vírus em campos experimentais no Brasil, são necessários em diferentes locais e condições endofoclimáticas, pois assim, será possível entender como essas relações agroecológicas ocorrem.

## ANEXO I: PROTOCOLOS

### 1) Extração de RNA (PLANT RNA Invitrogen)

- Pesar 100mg de amostra vegetal e macerá-las em nitrogênio líquido usando cadinho e pistilo até virar um pó
- Transferir o macerado ainda congelado para um tubo de microcentrifuga de 2 ml
- Adicionar 1 ml do reagent “Pure Link Plant RNA Reagent (Sigma)” gelado (4°C) na amostra ainda gelada
- Incubar o tubo contendo a mistura por 5 minutos sob agitação em vortex à temperatura ambiente
- Centrifugar a 13000 RPM por 5 minutos a 4°C
- Transferir o sobrenadante para novos tubos de 2 ml e adicione 200 uL de 5M de NaCl
- Misturar por inversão
- Para cada 1 ml de sobrenadante, adicione 600uL de clorofórmio e misture por inversão
- Deixar 30 minutos no gelo ou de um dia para o outro na geladeira (8°C).
- Centrifugue a 13000 RPM por 30 minutos a 4°C para separar as fases
- Transferir o sobrenadante para um tubo RNase free (~500uL)
- Adicionar 1ml de isopropanol gelado, misture e deixe descansar à temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar a 13000 RPM por 30 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante (CUIDADO COM O “PELLET”)
- Adicionar 500 uL de etanol 75% e centrifugue a 13000 RPM por 5 minutos
- Descartar o sobrenadante e adicionar 100 uL de água DEPC estéril

### “RNA cleanup”: etapa de purificação do RNA extraído usando o mini kit de extração de RNA da QIAGEN

- Adicionar 350 uL do tampão RLT e misturar bem
- Adicionar 250 uL de etanol 100% e transferir ~700 uL para uma coluna rosa presente no kit (*RNeasy Mini Spin Column*)
- Centrifugar a 8000 xg por 1 minuto e descarte o que passou da coluna
- Adicionar 500 uL do tampão RPE na coluna e centrifugue a 8000 xg por 1 minuto. Repita o procedimento.
- Adicionar 50 uL de água estéril “RNase-free water” ou DEPC na coluna e centrifugue por 2 minutos a 8000 xg
- Usar 5uL para corer um gel de RNA agarose 1% e 2 uL para quantificar no nanovil

### 2) RT 1 (M-MLV Invitrogen)

- Usar 5 uL do RNA total
- Adicionar 1 uL de dNTP na concentração de 10mM e 1 uL de oligonucleotídeo (antisense específico, oligodT ou randômico)
- Levar ao termociclador a 65° C por 5 minutos
- Após isso, coloque no gelo e deixe por 1 minuto
- Adicionar 4 uL do tampão 5X, 2uL do DTT e 1 uL de RNase OUT ou água DEPC
- Levar ao termociclador a 37°C por 2 minutos
- Após isso, colocar no gelo e deixe por 1 minuto



- Misturar bem, adicionar 500 uL de N-butanol e centrifugar por 10 minutos a 13000 RPM.
- Descartar o sobrenadante, ressuspenda o “pellet” com 4 uL de água estéril.
- Em um isopor com gelo, colocar uma cubeta para eletroporação com eletrodo de alumínio e deixe gelar por 5 minutos.
- Adicionar 2 ul da ligação em 40 ul de célula competente e depois, passar esse conteúdo para a cubeta.
- Com o auxílio de um eletroporador, a cubeta é inserida e a partir de um pulso elétrico curto e de alta voltagem o plasmídeo contendo o DNA recombinante é inserido na bactéria a partir de poros existentes em sua membrana.
- Após o pulso elétrico, adicionar 950 ul de meio LB líquido e incubar sob agitação de 180 RPM por 1 hora a 37°C
- Adicionar 100 ul do inóculo em uma placa de Petri com meio LB sólido contendo antibiótico
- Se o vetor usado for o pGEM T Easy, adicionar 25 ul de ampicilina em uma placa com 25 ml de meio LB sólido, 20 ul de IPTG e 25 ul de X/Gal
- Se o vetor usado for o pDONR, adicionar 15 ul de gentamicina em uma placa com 25 ml de meio LB sólido.
- Se o vetor usado for o pPIC9, adicionar apenas ampicilina em uma placa com 25 ml de meio LB sólido na concentração 1:1.
- Após isso, incubar a 37°C por 24 horas.
- Selecionar as colônias por PCR de colônia e digestão enzimática

## 7) Produção de células competentes de *E coli* DH10β

- **Soluções:**

- **Meio LB sólido:** 10g de Triptona

- 5g de Extrato de Levedura

- 4g de NaCl

- 15g de Ágar Bacteriológico

- H<sub>2</sub>O destilada (1L)

- Autoclavar e verter 25 ml em uma placa de Petri

- **Meio LB líquido:** 10g de Triptona

- 5g de Extrato de Levedura

- H<sub>2</sub>O destilada (1L)

- Autoclavar em 2 frascos de Erlenmeyer de 1L com a boca vedada

- OBS: Separar 50 ml de meio LB líquido em um Erlenmeyer de 100 ml para preparar o pré-inóculo

- **Glicerol 10% autoclavado (500 ml)**

- **Água MilliQ autoclavada (1L)**

- **Materiais estéreis:** Microtubos de 1,5 ml

- Caixas com ponteiras de 200uL e 1000uL

- Tubos Falcons de 50 ml

- Palitos de dente

- Com um palito estéril, introduzir em um tubo contendo célula de *E. coli* DH10β e riscar em uma placa de Petri contendo meio LB sólido. Deixar crescer por 24 horas a 37°C.

- No dia seguinte, selecionar uma colônia branca/translúcida e inocular em 50 ml de meio LB líquido para o preparo do pré-inóculo. Incubar sob agitação a 180 RPM por 24 horas a 37°C.
- No dia seguinte, inserir 25 ml em cada um dos Erlenmeyers de 1L contendo meio LB líquido
- Incubar sob agitação a 180 RPM por 24 horas a 37°C até atingir  $A_{600nm} = 0,6$ .
- Distribuir os inóculos finais em 4 tubos de ultracentrífuga de 250 ml e deixar por 15 minutos no gelo.
- Centrifugar a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante.
- Adicionar 50 ml de água gelada em cada um dos tubos de 250 ml e ressuspender o “pellet”. Transfira para 4 tubos Falcons de 50 ml e centrifugue a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C. Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 25 ml de água gelada em cada um dos tubos e ressuspender o “pellet”. Reduza para 2 tubos Falcons de 50 ml e centrifugue a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C. Descarte o sobrenadante
- Adicionar 1 ml de glicérol 10% em cada um dos dois Falcons (volume final de 2 ml). Ressuspender cuidadosamente os “pellets”.
- Distribuir rapidamente a suspensão de células em microtubos de 1,5 ml adicionando 40uL em cada tubo.
- Armazenar em freezer -80°C.
- OBS: Todas as etapas fora da centrífuga devem ser feitas ao gelo.

#### 8) RT 2 (SSIV Invitrogen)

- Usar 5uL de RNA total
- Adicionar 1 uL de dNTP na concentração de 10mM e 1 uL de oligonucleotídeo (antisense específico, oligodT ou randômico)
- Levar ao termociclador a 65°C por 5 minutos e depois leve ao gelo por 1 minuto
- Adicionar 4 uL do tampão 5X, 2 uL de DTT e 1uL de RNase OUT ou água DEPC e misture bem
- Por último, adicionar 1 uL da enzima SSIV
- Levar ao termociclador a 55°C por 1 hora e depois a 80°C por 10 minutos

#### 9) PCR 2 (Taq *LongAmp* BioLabs)

- Para cada 25uL de reação que irá em um microtubo de 200uL, acrescentar 12,25 uL de água estéril
- Adicionar 5 uL do tampão 5X, 0,75 uL de dNTP na concentração de 10mM, 1 uL de oligonucleotídeo senso e mais 1 uL do antisense (ambos na concentração de 10mM) e misturar bem
- Adicionar 1 uL da enzima taq polymerase *LongAmp* e por último, adicionar 4uL de cDNA
- **Programa:** 94°C por 1 minuto
 

94°C por 30 segundos	}	34 x
58°C por 1 minuto		
65°C por 45 segundos		
65°C por 10 minutos		
10°C ao ∞		

### **10) Digestão enzimática (Anza)**

- Em um microtubo de 1,5ml adicionar 16 uL do DNA (a uma concentração de ~15ng/uL) a ser digerido
- Acrescentar 2 uL do tampão 10X (Anza Red 10X Buffer)
- Se for digestão enzimática usando duas enzimas diferentes, acrescentar 1 uL de cada enzima. Caso seja uma digestão de apenas uma enzima, acrescentar apenas 2 uL.
- O volume total da reação deve ser de 20uL
- Misturar bem e deixar agir a 37°C de 16 a 20 horas

### **11) Extração de DNA plasmidial (Wizard® *Plus Minipreps DNA Purification System* Promega)**

- Após selecionar as colônias em placa, colocá-las para crescer em 5 ml de meio LB contendo antibiótico e deixar crescer a 37°C por 24 horas
- Adicionar 1 ml de meio em um microtubo de 1,5 ml e centrifugar por 5 minutos a 13000 RPM (repetir 4 vezes e estocar com glicerol 10% 1 ml do meio a -80°C)
- Ressuspender o a fração sólida com 250 uL da solução “Cell Resuspension Solution”
- Adicionar 250 uL da solução “Cell Lysis Solution” e misturar por inversão
- Adicionar 10 uL da solução “Alkaline Protease Solution” e misturar por inversão. Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente
- Adicionar 350 uL da solução “Neutralization Solution” e misturar no vortex por 1 minuto
- Centrifugar por 10 minutos a 13000 RPM em temperature ambiente
- Colocar uma coluna em tubo coletor, colete o sobrenadante e passe para a coluna
- Centrifugar por 1 minuto a 13000 RPM e descarte o permeato
- Adicionar 750 uL da solução “Wash Solution”, centrifugue por 1 minuto a 13000 RPM e descarte o permeato
- Repetir o procedimento anterior com 250 uL da mesma solução e centrifugar por 2 minutos a 13000 RPM
- Transferir a coluna para um novo microtubo de 1,5 ml estéril, adicionar 100 uL de água estéril e centrifugar por 1 minuto a 13000 RPM
- Descartar a coluna e estocar o DNA a -20°C

### **12) Produção de células competentes de *E. coli* Shuttle T7®**

#### • **Soluções:**

- **Meio LB sólido:** 10g de Triptona

5g de Extrato de Levedura

4g de NaCl

15g de Ágar Bacteriológico

H<sub>2</sub>O destilada (1L)

Autoclavar e verter 25 ml em uma placa de Petri

- **Meio LB líquido:** 10g de Triptona

5g de Extrato de Levedura

H<sub>2</sub>O destilada (1L)

Autoclavar em 2 frascos de Erlenmeyer de 1L com a boca vedada

OBS: Separar 50 ml de meio LB líquido em um Erlenmeyer de 100 ml para preparar o pré-inóculo

- **Glicerol 10% autoclavado (500 ml)**

- **Água MilliQ autoclavada (1L)**

- **Materiais estéreis:** Microtubos de 1,5 ml

Caixas com ponteiros de 200uL e 1000uL

Tubos Falcons de 50 ml

Palitos de dente

- Com um palito estéril, introduzir em um tubo contendo célula de *E. coli* Shuttle T7 ® e riscar em uma placa de Petri contendo meio LB sólido. Deixar crescer por 24 horas a 37°C.
- No dia seguinte, selecionar uma colônia branca/translúcida e inocular em 50 ml de meio LB líquido para o preparo do pré-inóculo. Incubar sob agitação a 180 RPM por 24 horas a 37°C.
- No dia seguinte, inserir 25 ml em cada um dos Erlenmeyers de 1L contendo meio LB líquido
- Incubar sob agitação a 180 RPM a 37°C até atingir  $A_{600nm} = 0,6$ .
- Distribuir os inóculos finais em 4 tubos de ultracentrífuga de 250 ml e deixar por 15 minutos no gelo.
- Centrifugar a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante.
- Adicionar 50 ml de água gelada em cada um dos tubos de 250 ml e ressuspender o “pellet”. Transferir para 4 tubos Falcons de 50 ml e centrifugue a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C. Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 25 ml de água gelada em cada um dos tubos e ressuspender o “pellet”. Reduza para 2 tubos Falcons de 50 ml e centrifugue a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C. Descarte o sobrenadante
- Adicionar 1 ml de glicerol 10% em cada um dos dois Falcons (volume final de 2 ml). Ressuspender cuidadosamente os “pellets”.
- Distribuir rapidamente a suspensão de células em microtubos de 1,5 ml e adicionar 100uL em cada tubo.
- Armazenar em freezer -80°C.
- OBS: Todas as etapas fora da centrífuga devem ser feitas no gelo.

### **13) Transformação e clonagem em *E. coli* Shuttle T7 ®**

- Pegar 1 ul de DNA recombinante e aplique em 100 ul em um microtubo de célula competente.
- Deixar por 30 minutos no gelo e depois disso, 1 minuto a 42°C.
- Após isso, acrescentar 900 ul de meio LB líquido e incubar sob agitação por 180 RPM a 37°C por 1 hora.
- Adicionar 100 ul em uma placa contendo meio LB sólido com antibiótico canamicina na concentração 1:1
- Incubar a 37°C por 24 horas
- Selecionar as colônias por PCR de colônia e dupla digestão

### **14) PCR 3 (Taq *Phusion DNA Polymerase* Thermo Scientific)**

- Para cada 20uL de reação que irá em um microtubo de 200uL, acrescentar 10,4 uL de água estéril

- Adicionar 4 uL do tampão 5X, 0,8 uL de DMSO (100%), 0,4 uL de dNTP na concentração de 10mM, 1 uL de oligonucleotídeo senso e mais 1 uL do antisense (ambos na concentração de 10mM) e misture bem
- Adicionar 1 uL da enzima taq polymerase *Phusion High Fidelity* e por último, adicionar 0,2uL de cDNA
- **Programa:** 98°C por 30 segundos  
 98°C por 20 segundos  
 60°C por 30 segundos  
 72°C por 2 minutos e 30 segundos  
 72°C por 10 minutos  
 12°C ao ∞
 } 34 x

### 15) Produção de células competentes de *A. tumefaciens*

- **Soluções:**

- **Meio LB3 sólido:** 10g de Triptona

5g de Extrato de Levedura

4g de NaCl

3g de MgSO<sub>4</sub>

1g de KCl

15g de Ágar Bacteriológico

H<sub>2</sub>O destilada (1L)

Autoclavar e verter 25 ml em uma placa de Petri

- **Meio LB3 líquido:** 10g de Triptona

5g de Extrato de Levedura

3g de MgSO<sub>4</sub>

1g de KCl

H<sub>2</sub>O destilada (1L)

Autoclavar em 2 frascos de Erlenmeyer de 1L com a boca vedada

OBS: Separar 50 ml de meio LB líquido em um Erlenmeyer de 100 ml

para preparar o pré-inóculo

- **Glicerol 10% autoclavado (500 ml)**

- **Água MilliQ autoclavada (1L)**

- **Materiais estéreis:** Microtubos de 1,5 ml

Caixas com ponteiras de 200uL e 1000uL

Tubos Falcons de 50 ml

Palitos de dente

- Com um palito estéril, introduzir em um tubo contendo célula de *E. coli* DH10β e riscar em uma placa de Petri contendo meio LB sólido. Deixar crescer por 48 horas a 28°C.
- No dia seguinte, selecionar uma colônia branca/translúcida e inocular em 50 ml de meio LB líquido para o preparo do pré-inóculo. Incubar sob agitação a 180 RPM por 48 horas a 28°C.
- No dia seguinte, inserir 25 ml em cada um dos Erlenmeyers de 1L contendo meio LB líquido
- Incubar sob agitação a 180 RPM a 28°C até atingir A<sub>600nm</sub> = 0,6.

- Distribuir os inóculos finais em 4 tubos de ultracentrífuga de 250 ml e deixar por 15 minutos no gelo.
- Centrifugar a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante.
- Adicionar 50 ml de água gelada em cada um dos tubos de 250 ml e ressuspenda o “pellet”. Transferir para 4 tubos Falcons de 50 ml e centrifugar a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C. Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 25 ml de água gelada em cada um dos tubos e ressuspenda o “pellet”. Reduzir para 2 tubos Falcons de 50 ml e centrifugue a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C. Descartar o sobrenadante
- Adicionar 1 ml de glicerol 10% em cada um dos dois Falcons (volume final de 2 ml). Ressuspenda cuidadosamente os “pellets”.
- Distribuir rapidamente a suspensão de células em microtubos de 1,5 ml e adicionar 40uL em cada tubo.
- Armazenar em freezer -80°C.
- OBS: Todas as etapas fora da centrifuga devem ser feitas ao gelo.

### 16) Transformação e clonagem em *A. tumefaciens* GV 3101

- Em um isopor com gelo, coloque uma cubeta para eletroporação com eletrodo de alumínio e deixe gelar por 5 minutos.
- Adicionar 0,5 ul LR Clonase em 40 ul de célula competente e depois, passe esse conteúdo para a cubeta.
- Com o auxílio de um eletroporador, a cubeta é inserida e a partir de um pulso elétrico curto e de alta voltagem o plasmídeo contendo o DNA recombinante é inserido na bactéria a partir de poros existentes em sua membrana.
- Após o pulso elétrico, incubar por agitação a 180 RPM por 2 horas a 28°C.
- Adicionar 100 ul do inóculo em uma placa contendo 25 ml de meio LB3 sólido juntamente com os antibióticos rifampicina, gentamicina e espectinomicina nas concentrações 1:1
- Incubar a 28°C por 48 horas
- Após isso, selecionar as colônias e confirmar por PCR de colônia.

### 17) Indução e agroinfiltração

#### ➤ Soluções:

- **Tampão de indução (1L):** 10,5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
4,5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,5g Citrato de Na 2H<sub>2</sub>O  
0,25g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1mM)  
2g sucrose  
5ml de glicerol (final 0,25% v/v)  
Autoclavar e estocar 40 ml em tubos Falcons de 50 ml
- **Tampão de indução completo (40ml):** 40 ml de tampão de indução  
10 ul de aceroseringona (200mM in 100% DMSO)  
400 ul de MÊS 1 M pH 5,6
- **MES:** Preparar 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada  
Adicionar 195,24g de MES  
Ajustar o pH para 5,6

Completar para 1L de H<sub>2</sub>O destilada

- **MS completo 10X (1 L):** 30g sucrose  
4 g MS em pó  
10 ml de MÊS 1 M pH 5,7-5,8  
750 uL de acetoseringona a 200mM

OBS: Para o MS 1X, use 5 ml do 10X em um tubo Falcon de 50 e adicione 45 ml de água destilada

- Colocar os clones de interesse que foram clonados em *A. tumefaciens* para crescer em um tubo Falcon de 50 ml apenas 5 ml de meio LB3 líquido contendo 5 ul de rifampicina, 1,5 ul de gentamicina e 5ul de espectinomicina a 180 RPM a 28°C por 24 horas.
  - Em um outro tubo Falcon estéril, coloque 2 ml do que cresceu e adicione 4 ml de tampão de indução. Incubar sob agitação por 180 RPM a 28°C por 24 horas.
  - Quando atingir OD=2, distribuir a solução em microtubos de 2 ml e centrifugar a 13000 RPM por 10 minutos.
  - Adicionar 2 ml de Tampão MS 1X e dilua o “pellet”.
  - Use uma seringa para sugar o conteúdo do tubo e agroinfiltrar nas folhas de *N. benthamiana*.
- OBS: 30 minutos antes de iniciar o processo de agroinfiltração nas folhas, preparar uma câmara escura. Em um isopor adicionar um pouco de água, colocar a planta que será agroinfiltrada e manter o isopor tampado por 30 minutos. Esse procedimento induzirá a abertura dos estômatos facilitando a agroinfiltração.