



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Análise metagenômica de sequências de vírus de plantas em água de esgoto e caracterização da *ORFN1* putativa do pepper ringspot virus

Macária Ferreira Duarte

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Tese de Doutorado

Brasília - DF, 2023.



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Análise metagenômica de sequências de vírus de plantas em água de esgoto e caracterização da *ORFN1* putativa do pepper ringspot virus

Macária Ferreira Duarte

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Microbiana.

Brasília - DF, 2023.

Macária Ferreira Duarte

Análise metagenômica de sequências de vírus de plantas em água de esgoto e caracterização da *ORFN1* putativa do pepper ringspot virus

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata - PPG Biologia Microbiana - UnB
(Presidente da banca e orientador)

Prof.^a Dr.^a Eliane Ferreira Noronha - PPG Biologia Microbiana - UnB
(Membro titular interno)

Dr.^a Rosana Blawid - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
(Membro titular externo)

Dr. Roberto Ramos Sobrinho - Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro (UENF)
(Membro titular externo)

Dr. Renato de Oliveira Resende – PPG Biologia Molecular - UnB
(Membro suplente)

“DNA neither cares nor knows. DNA just is. And we dance to its music.”

Richard Dawkins

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a minha família por todo suporte, apoio e conforto nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu orientador Dr. Tatsuya Nagata por ter me acolhido, pelo tempo de ensinamentos, paciência, incentivo e apoio essenciais para a elaboração desse trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de Virologia, Caterynne, Ikaro, Marina, Helena, Amanda, Stephanny, Bruno e Paloma, por sempre estarem a disposição para ajudar e por tornar o ambiente de trabalho mais divertido e agradável.

Aos meus queridos amigos Ísis, Larissa, Stéfania e Stephanie, pelo incentivo, apoio, torcida e amizade.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, seu corpo docente, direção e administração que contribuíram com a realização da minha pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada.

Meu muito obrigada a todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, ajudaram na construção dessa tese.

Obrigada!

Resumo Geral

O monitoramento regular de vírus em espécies vegetais cultivadas é crucial para o manejo de fitoviroses. A identificação rápida e precisa de vírus que, potencialmente, apresentam alto risco pode auxiliar na prevenção de surtos epidêmicos severos em culturas de importância econômica. Atualmente, as tecnologias de *High-Throughput Sequencing* (HTS) tornaram-se uma ferramenta acessível e poderosa para essa finalidade. Entretanto, o método utilizado na coleta de amostras é um dos assuntos importantes ao se empregar esta tecnologia. Além disso, em muitos casos, o HTS é usado com amostras combinadas em forma de "pool", o que torna a mistura das amostras também uma discussão importante. Neste estudo, avaliamos o uso de amostras de águas residuais para monitorar vírus de plantas usando análise HTS e RT-qPCR. Fitovírus pertencentes a 12 famílias foram encontrados em águas residuais, das quais *Virgaviridae*, *Solemoviridae*, *Tymoviridae*, *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Closteroviridae* e *Secoviridae* foram os mais abundantes, sendo representadas por mais de 20 espécies. Adicionalmente, um vírus quarentenário e uma possível nova espécie de tobamovírus foram descobertos. Foi analisada ainda a relevância de alimentos processados como fonte desses vírus em águas residuais. O pepper mild mottle virus foi detectado em abundância em amostras de alimentos processados à base de pimenta e amostras de água de esgoto, e o garlic common latent virus foi observado em menor quantidade em amostras de alho seco e fresco e amostras de água de esgoto. Esses dados sugerem uma alta correlação entre a abundância viral no esgoto e nas fontes de alimentos processados. O uso potencial de águas residuais para pesquisa de vírus é discutido neste estudo. Além do monitoramento de vírus, também é de grande importância o estudo de vírus já conhecidos que podem ter importância econômica não apenas no quesito fitossanitário, mas também tecnológico como o uso de clones infecciosos. O pepper ringspot virus (PepRSV) até o momento é o único tobavírus relatado no Brasil como patógeno de tomateiro e, principalmente, pimenteiro. No nosso laboratório, este vírus é utilizado como modelo para estudo da interação vírus-planta usando clones infecciosos, bem como vetor viral vegetal para expressão de proteínas recombinantes. Este trabalho também apresenta como objetivo o

estudo de um gene putativo (*ORFN1*) do PepRSV. Construções virais contendo mutações na *ORFN1* foram agroinfiltrados em folhas de *Nicotiana benthamiana* e sua expressão e localização subcelular foram demonstradas a partir da fusão da proteína com proteínas de fluorescência por Western blotting e microscopia confocal. Sintomas distintos do tratamento controle (clone infeccioso sem mutações), como a ativação de lesões locais, murcha e tombamento, foram observados nas plantas inoculadas com os isolados mutantes. Finalmente, a *ORFN1/GFP* mostrou localização associada ao retículo endoplasmático.

Palavras-chave: *High throughput sequencing, viroma de esgoto, Pepper ringspot virus, localização intracelular.*

General Abstract

Regular monitoring of viruses in cultivated plant species is crucial for the management of phytoviruses. The rapid and accurate identification of potentially high-risk viruses can help prevent severe epidemic outbreaks in economically important crops. Currently, High-Throughput Sequencing (HTS) technologies have become an accessible and powerful tool for this purpose. However, the method used in sample collection is one of the important issues when using this technology. Furthermore, in many cases, the HTS is used with pooled samples, which makes sample mixing an important issue as well. In this study, we evaluated the use of wastewater samples to monitor plant viruses using HTS analysis and RT-qPCR. Phytoviruses belonging to 12 families were found in wastewater, of which *Virgaviridae*, *Solemoviridae*, *Tymoviridae*, *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Closteroviridae* and *Secoviridae* were the most abundant, being represented by more than 20 species. Additionally, a quarantine virus and a possible new species of tobamovirus were discovered. The relevance of processed foods as a source of these viruses in wastewater was also analysed. Pepper mild mottle virus was detected in abundance in samples of pepper-based processed foods and in sewage water samples, and garlic common latent virus was observed in smaller amounts in dried and fresh garlic samples and in sewage water samples. These data suggest a high correlation between viral abundance in sewage and in processed food sources. The potential use of wastewater for virus research is discussed in this study. In addition to virus monitoring, it is also of great importance to study known viruses that may have economic importance not only in the phytosanitary aspect, but also technologically, such as the use of infectious clones. Pepper ringspot virus (PepRSV) so far is the only tobavirus reported in Brazil as a pathogen of tomato and, mainly, pepper. In our laboratory, this virus is used as a model to study the virus-plant interaction using infectious clones, as well as a plant viral vector for expression of recombinant proteins. This work also aims to study a putative gene (ORFN1) of PepRSV. Viral constructs containing mutations in ORFN1 were agroinfiltrated in leaves of *Nicotiana benthamiana* and their expression and subcellular localization were demonstrated from protein fusion

with fluorescence proteins by Western blotting and confocal microscopy. Symptoms distinct from the control treatment (infectious clone without mutations), such as activation of local lesions, wilting and damping off, were observed in plants inoculated with the mutant isolates. Finally, ORFN1/GFP showed localization associated with the endoplasmic reticulum.

Keywords: *High throughput sequencing, sewage virome, Pepper ringspot virus, intracellular localization.*

Sumário

Resumo Geral	6
General Abstract	8
Introdução Geral	13
Parte I - Tema 1: Análise metagenômica de sequências de vírus de plantas em água de esgoto	16
Metagenômica de vírus de plantas	16
Vírus de plantas em água de esgoto	17
Justificativa	20
Objetivos.....	20
Objetivo geral	20
Objetivos específicos;	20
Referências.....	21
Capítulo 1:	25
Metagenomic analyses of plant virus sequences in sewage water for plant viruses monitoring	25
1.1 Abstract.....	26
1.2 Introduction	27
1.3 Material and Methods.....	28
1.3.1 Sample preparation and HTS	28
1.3.2 Virus genome sequence assembly and phylogenetic analysis	29
1.3.3 RT-qPCR	30
1.4 Results	31
1.5 Discussion.....	45
Supplementary files	49

1.6	References.....	53
Parte II - Tema 2: Caracterização da <i>ORFN1</i> putativa do pepper ringspot virus.....		
	virus.....	56
	Família <i>Virgaviridae</i>	56
	Gênero <i>Tobravirus</i>	57
	Organização genômica dos <i>Tobravirus</i>	57
	Pepper ringspot virus.....	59
	Objetivos.....	62
	Objetivo geral.....	62
	Objetivos específicos	63
	Referências.....	63
	Capítulo 2:.....	67
	Expressão <i>in vivo</i> do gene <i>ORFN1</i> de pepper ringspot virus (PepRSV-Ag1) e resposta diferencial de <i>Nicotiana benthamiana</i> à infecção por isolados mutantes	67
2.1	Introdução	67
2.2	Materiais e Métodos.....	69
2.2.1	Vírus	69
2.2.2	Produção de anticorpo por peptídeo sintético	69
2.2.3	Construção dos plasmídeos mutantes.....	72
2.2.4	Expressão da <i>ORFN1</i> em <i>E. coli</i> e análise por SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	75
2.2.5	Agroinfiltração dos mutantes da <i>ORFN1</i> em <i>N. benthamiana</i>	77
2.2.6	<i>Western blotting</i> dos mutantes da <i>ORFN1</i> expressos em <i>N. benthamiana</i>	78

2.2.7	Microscopia confocal	78
2.3	Resultados	79
2.3.1	Expressão da <i>ORFN1</i> em <i>E. coli</i> e análise por SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	79
2.3.2	Produção de anticorpo por peptídeo sintético	79
2.3.3	<i>ORFN1</i> foi expresso em plantas infectadas	80
2.3.4	<i>ORFN1</i> é indispensável para a produção da capa proteica	82
2.3.5	<i>ORFN1</i> está associada ao Reticulo Endoplasmático	84
2.4	Discussão.....	86
2.5	Conclusão	88
2.6	Referências	89

Introdução Geral

Devido aos protocolos de segurança por conta da pandemia de COVID-19, parte desta tese precisou ser realizada de forma remota, por tanto, ela foi dividida em duas partes, a primeira sendo realizada de forma remota com o auxílio de programas de bioinformática e se trata da análise metagenômica de sequências de vírus de plantas em água de esgoto, e na segunda parte, foram retomados os trabalhos em bancada e foi dada continuação no tema que havia sido iniciado antes da pandemia, a caracterização da putativa *ORFN1* do pepper ringspot virus (PepRSV).

O tema de estudo da primeira parte desta tese tem como estudo relacionados ao pepper mild mottle virus (PMMoV) e seu papel como indicador de contaminação fecal vários ambientes em águas urbanas em todo o mundo (Rosario et al., 2009; Kitajima et al., 2018; Symonds et al., 2018; Gyawali et al., 2019; Bonanno Ferraro et al., 2021). O PMMoV é um fitopatógeno que pertence ao gênero *Tobamovirus*, e possui genoma de RNA de fita simples e partículas virais muito robustas, e que apesar de ser um vírus de plantas, vem sendo indicado como um dos vírus de plantas mais abundantemente encontrados em amostras fecais humanas (Zhang et al., 2006; Nakamura et al., 2009). As partículas de PMMoV são tão estáveis que podem ser infecciosas até mesmo após a purificação de fezes humanas (Zhang et al., 2006). Desde então, o PMMoV tem sido considerado de grande potencial como indicador de contaminação fecal humana ao invés de usar indicadores bacterianos, que podem causar problemas de falsos positivos com uma certa frequência (Brownell et al., 2007).

Curiosamente, não apenas o PMMoV, mas também outros tobamovírus e membros da família *Tymoviridae* também foram encontrados nas amostras fecais humanas em boa quantidade (Zhang et al., 2006; Nakamura et al., 2009). Essas observações da presença de vírus de plantas em amostras fecais humanas e sistemas hídricos ambientais levantou questionamentos com relação a diversidade e abundância de vírus de plantas em água de esgoto e para este estudo, a metagenômica foi nossa ferramenta, para nos auxiliar a fazer um levantamento desses dados a partir de coletas de esgoto bruto coletados na estação de tratamento de água de esgoto de Brasília. Os dados demonstraram uma relevante quantidade de vírus de plantas presentes nas amostras e também foi possível confirmar a presença do PMMoV, entre outros vírus de relevância.

O tema de estudo da segunda parte está relacionado a caracterização da putativa *ORFN1* do PepRSV. O PepRSV, também conhecido como vírus da mancha anelar do pimentão ou vírus da faixa amarela do tomateiro é descrito, até o momento, somente no Brasil, podendo causar doenças em culturas de pimenta, alcachofra, patchuli e tomate (Kitajima 2020). O primeiro isolado a ser caracterizado foi proveniente de pimenta e é conhecido como isolado CAM (Campinas-SP). Em 2012, a ocorrência de dois isolados de PepRSV foi relatada em tomateiro rasteiro em Luziânia, Goiás, denominados LAV e Pivo4 (Batista et al., 2014). E em 2016, um novo isolado foi identificado em Alexandre Gusmão, Distrito Federal, denominado Ag1, provocando infecção em plantas de tomateiro estaqueado tipo “grape” (Taraves-Esashika, 2021).

O objetivo geral desta segunda parte foi de avaliar a funcionalidade de uma ORF adicional (*ORFN1* putativa) presente em todos os isolados de PepRSV (e ausente nas outras duas espécies de tobnavírus), prevista a montante do gene da capa proteica. A proteína putativa foi analisada e apresentou um domínio transmembranar semelhante a 6K2 do potyvírus do turnip mosaic virus (TuMV) e TGB3 de potexvírus, plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), que estão envolvidas na ativação de fatores de transcrição em *Arabidopsis thaliana*, envolvidos no mecanismo de ativação da resposta a proteínas mal enoveladas, uma resposta citoprotetora, relacionada ao retículo endoplasmático.

A caracterização dessa provável *ORFN1* foi realizada a partir de clones infecciosos de isolado Ag1 do PepRSV. A proteína da *ORFN1* foi tentada para expressão em diferentes sistemas (bactéria e planta) para produção de antissoro policlonal. Também foi realizado estudo de detecção e localização subcelular da proteína em *N. benthamiana* por meio de técnicas de fusão com proteínas de fluorescência (mGFP e mCherry), *Western blotting*, imunomarcacão e microscopia confocal a laser, além disso, foi realizado estudo de mutantes da *ORFN1* em *N. benthamiana*.

Parte I - Tema 1: Análise metagenômica de sequências de vírus de plantas em água de esgoto

Metagenômica de vírus de plantas

Os estudos metagenômicos utilizando a abordagem de sequenciamento de alto rendimento (*high-throughput sequencing*, HTS) podem fornecer aos virologistas ferramentas importantes para detecção de vírus de plantas, e assim auxiliar na prevenção de problemas fitossanitários em áreas de cultivo de espécies vegetais importantes socioeconomicamente (Roossinck et al., 2015). Possibilitam ainda inferir sobre possíveis formas de transmissão de vírus de plantas diferentes dos modos clássicos de interação planta-vírus-vetor. A forma clássica de estudo de transmissão de vírus de plantas, onde se tem os insetos como principais vetores de transmissão, pode precisar ser revista para incluir outros vetores como grandes herbívoros (Ng et al., 2014), roedores (Phan et al., 2011) e água de irrigação (Rosario et al., 2009; Hamza et al., 2011; Haramoto et al., 2013).

Com o auxílio do HTS, juntamente com a avaliação laboratorial, a virologia vegetal poderá desvendar formas de dispersão virais além dos sistemas clássicos e além dos sistemas de cultivo, tendo em vista que há uma necessidade de novas abordagens para a vigilância viral que forneçam uma

visão mais ampla e menos tendenciosa da circulação de patógenos virais para complementar as formas de vigilância atuais (Maree et al., 2018).

Estudos envolvendo metagenômica fornecem meios para a vigilância a longo prazo de viromas e juntamente com a avaliação laboratorial, esses estudos avançariam em muito a nossa compreensão dos processos pelos quais os vírus derivam de seus hospedeiros naturais para se tornarem ameaças economicamente significativas para a produção agrícola.

Vírus de plantas em água de esgoto

A descoberta, a partir da metagenômica, da microbiota e viromas associados a água de esgoto tem sido utilizada como uma estratégia de vigilância sanitária no decorrer dos anos, principalmente no campo de patógenos relacionados a humanos (Fernandez-Cassi et al., 2018; Hendriksen et al., 2019; Nieuwenhuijse et al., 2020). O esgoto forma um ecossistema que abrange comunidades microbianas muito ricas, proveniente de plantas e animais como roedores, pássaros e morcegos (Cantalupo et al., 2011). Nesses ambientes, os vírus associados aos resíduos biológicos de uma cidade são misturados aos vírus de todos os organismos que vivem nela, formando assim uma fonte inexplorada de diversidade viral (Ng et al., 2012).

Os vírus já têm sido usados como indicadores de poluição fecal, especialmente, vírus entéricos de humanos transmitidos pela via fecal-oral, e várias famílias já foram identificadas em esgoto bruto, incluindo membros das famílias *Adenoviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae* e *Reoviridae*, as quais vêm

sendo utilizadas em diversos estudos para identificar poluição fecal no ambiente (Farkas et al., 2018; Guajardo-Leiva et al., 2020; Adriaenssens et al., 2021). Além dos vírus que infectam humanos, descobriu-se que outros vírus eliminados nas fezes podem ser úteis como indicadores de poluição fecal, como é o caso do patógeno de plantas pepper mild mottle virus (PMMoV), um vírus de RNA fita simples de sentido positivo que pertence ao gênero *Tobamovirus* e infecta pimentas e pimentões (Fauquet & Fargette, 2005).

O PMMoV foi identificado como o vírus mais abundante encontrado em uma pesquisa metagenômica de vírus de RNA de fezes humanas (Zhang et al., 2005). Os vírions do PMMoV são extremamente estáveis e demonstraram manter sua infectividade em plantas a partir de produtos alimentares processados de pimenta, como por exemplo, molho de pimenta (Colson et al., 2010), e até mesmo após a passagem pelo intestino humano (Zhang et al., 2005; Colson et al., 2010). Quando excretado nas fezes humanas, o PMMoV por ser encontrado em concentrações de 1 milhão a 1 bilhão de partículas virais por grama (Zhang et al., 2005).

Além do PMMoV, cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), outro vírus de planta, também vem sendo encontrado em abundância em amostras de esgoto em vários países (Jumat et al., 2017; Robledo-Mahón et al., 2019; Bačnik et al., 2020; Yang et al., 2021). O CGMMV é considerado um dos principais patógenos de culturas da família *Cucurbitaceae* no mundo, as principais culturas afetadas por esses vírus são pepino, tomate e pimenta, sendo os insetos os vetores mais comuns (Darzi et al., 2018), e é uma praga quarentenária ausente no Brasil. Embora as concentrações de CGMMV não

tenham sido relatadas, estudos sugerem que ele pode ser tão abundante quanto o PMMoV em águas residuais tratadas (Jumat et al., 2017; Bačnik et al., 2020).

Neste contexto, surgiu o questionamento de que além da relevância de estudos de vigilância de vírus em esgoto não só para patógenos humanos, como também, se a presença tão abundante de vírus de plantas presente em água de esgoto podem vir a causar preocupação com relação a vigilância fitossanitária, tendo em vista que em alguns casos o fitovírus permaneceu infectivo para plantas mesmo depois de coletado em amostras de esgoto (Bačnik et al., 2020). A presença de fragmentos genômicos de vírus de plantas encontrados por HTS tem sido relatada (Cantalupo et al., 2011; Ng et al., 2012), porém esses estudos apenas descreveram brevemente a análise metagenômica de fitovírus.

Neste estudo, analisamos as sequências de vírus de plantas existentes na água de esgoto bruto em Brasília, Brasil, foram analisadas usando abordagens HTS. Além do PMMoV, foram encontradas várias espécies de vírus amplamente conhecidas e possíveis espécies novas. A presença de alguns desses fitovírus foi adicionalmente confirmada por RT-qPCR utilizando primers espécie-específicos. A interpretação de análises de viroma em águas residuais e o uso potencial desses dados metagenômicos para levantamento de vírus de plantas são discutidos abaixo.

Justificativa

Os sistemas agrícolas brasileiros são constantemente ameaçados pelo aparecimento de doenças causadas por patógenos emergentes e quarentenários, e o uso de modernas ferramentas de sequenciamento tem contribuído para o estabelecimento e adoção de rotinas de análise de amostras ambientais e de plantas para a identificação rápida de pragas quarentenárias relevantes no Brasil.

Objetivos

Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo contribuir com o sistema de alerta fitossanitário do Brasil, utilizando dados de metagenômica para avaliar a ocorrência dos vírus de plantas em amostras de água de esgoto de Brasília, do Distrito Federal.

Objetivos específicos;

1. Identificar a diversidade dos vírus de plantas em amostras de esgoto de Brasília;
2. Avaliar se espécies de vírus de plantas encontrados nas amostras de esgoto estão presentes também em amostras de produtos alimentares comercializados na região;
3. Montar genomas completos de vírus de interesse a partir dos dados obtidos por metagenômica.

Referências

ADRIAENSSENS, E.M.; FARKAS, K.; MCDONALD, J.E.; JONES, D.L.; ALLISON, H.E.; MCCARTHY, A.J. Tracing the fate of wastewater viruses reveals catchment-scale virome diversity and connectivity. **Water Research**, v.203, p.117568, 2021. DOI: 10.1016/J.WATRES.2021.117568.

BAČNIK, K.; KUTNJAK, D.; PECMAN, A.; MEHLE, N.; TUŠEK ŽNIDARIČ, M.; GUTIÉRREZ AGUIRRE, I.; RAVNIKAR, M. Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment. **Water Research**, v.177, p.115628, 2020. DOI: 10.1016/J.WATRES.2020.115628.

BONANNO FERRARO, G.; SUFFREDINI, E.; MANCINI, P.; VENERI, C.; IACONELLI, M.; BONADONNA, L.; MONTAGNA, M.T.; GIGLIO, O. DE; ROSA, G. LA. Pepper Mild Mottle Virus as Indicator of Pollution: Assessment of Prevalence and Concentration in Different Water Environments in Italy. **Food and Environmental Virology 2021 13:1**, v.13, p.117–125, 2021. DOI: 10.1007/S12560-020-09458-6.

BROWNELL, M.J.; HARWOOD, V.J.; KURZ, R.C.; MCQUAIG, S.M.; LUKASIK, J.; SCOTT, T.M. Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. **Water Research**, v.41, p.3747–3757, 2007. DOI: 10.1016/J.WATRES.2007.04.001.

CANTALUPO, P.G.; CALGUA, B.; ZHAO, G.; HUNDESA, A.; WIER, A.D.; KATZ, J.P.; GRABE, M.; HENDRIX, R.W.; GIRONES, R.; WANG, D.; PIPAS, J.M. Raw sewage harbors diverse viral populations. **mBio**, v.2, 2011. DOI: 10.1128/MBIO.00180-11/SUPPL_FILE/MBO005111170ST1.XLSX.

COLSON, P.; RICHET, H.; DESNUES, C.; BALIQUE, F.; MOAL, V.; GROB, J.J.; BERBIS, P.; LECOQ, H.; HARLÉ, J.R.; BERLAND, Y.; RAOULT, D. Pepper Mild Mottle Virus, a Plant Virus Associated with Specific Immune Responses, Fever, Abdominal Pains, and Pruritus in Humans. **PLOS ONE**, v.5, p.e10041, 2010. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0010041.

DARZI, E.; SMITH, E.; SHARGIL, D.; LACHMAN, O.; GANOT, L.; DOMBROVSKY, A. The honeybee *Apis mellifera* contributes to Cucumber green mottle mosaic virus spread via pollination. **Plant Pathology**, v.67, p.244–251, 2018. DOI: 10.1111/PPA.12702.

FARKAS, K.; COOPER, D.M.; MCDONALD, J.E.; MALHAM, S.K.;

ROUGEMONT, A. DE; JONES, D.L. Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. **Science of The Total Environment**, v.634, p.1174–1183, 2018. DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.04.038.

FAUQUET, C.M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virology Journal**, v.2, p.1–10, 2005. DOI: 10.1186/1743-422X-2-64/FIGURES/4.

FERNANDEZ-CASSI, X.; TIMONEDA, N.; MARTÍNEZ-PUCHOL, S.; RUSIÑOL, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; FIGUEROLA, N.; BOFILL-MAS, S.; ABRIL, J.F.; GIRONES, R. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. **Science of the Total Environment**, v.618, p.870–880, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.249.

GUAJARDO-LEIVA, S.; CHNAIDERMAN, J.; GAGGERO, A.; DÍEZ, B. Metagenomic Insights into the Sewage RNA Virosphere of a Large City. **Viruses** **2020**, **Vol. 12**, **Page 1050**, v.12, p.1050, 2020. DOI: 10.3390/V12091050.

GYAWALI, P.; CROUCHER, D.; AHMED, W.; DEVANE, M.; HEWITT, J. Evaluation of pepper mild mottle virus as an indicator of human faecal pollution in shellfish and growing waters. **Water Research**, v.154, p.370–376, 2019. DOI: 10.1016/j.watres.2019.02.003.

HAMZA, I.A.; JURZIK, L.; ÜBERLA, K.; WILHELM, M. Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. **Water Research**, v.45, p.1358–1368, 2011. DOI: 10.1016/j.watres.2010.10.021.

HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; KISHIDA, N.; KONNO, Y.; KATAYAMA, H.; ASAMI, M.; AKIBA, M. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p.7413–7418, 2013. DOI:10.1128/AEM.02354-13/ASSET/9B86CEA2-AF6B-42E5-8FD5-6DC5EFBF1C72/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991049130002.JPEG.

HENDRIKSEN, R.S.; MUNK, P.; NJAGE, P.; BUNNIK, B. VAN; MCNALLY, L.; LUKJANCENKO, O.; RÖDER, T.; NIEUWENHUIJSE, D.; PEDERSEN, S.K.; KJELDGAARD, J.; KAAS, R.S.; CLAUSEN, P.T.L.C.; VOGT, J.K.; LEEKITCHAROENPHON, P.; SCHANS, M.G.M. VAN DE; ZUIDEMA, T.; RODA HUSMAN, A.M. DE; RASMUSSEN, S.; PETERSEN, B.; AMID, C.; COCHRANE, G.; SICHERITZ-PONTEN, T.; SCHMITT, H.; ALVAREZ, J.R.M.; AIDARA-KANE, A.; PAMP, S.J.; LUND, O.; HALD, T.; WOOLHOUSE, M.; KOOPMANS, M.P.; VIGRE, H.; PETERSEN, T.N.; AARESTRUP, F.M. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of

urban sewage. **Nature Communications** 2019 **10:1**, v.10, p.1–12, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-08853-3.

JUMAT, M.R.; HASAN, N.A.; SUBRAMANIAN, P.; HEBERLING, C.; COLWELL, R.R.; HONG, P.-Y. Membrane Bioreactor-Based Wastewater Treatment Plant in Saudi Arabia: Reduction of Viral Diversity, Load, and Infectious Capacity. **Water** 2017, **Vol. 9, Page 534**, v.9, p.534, 2017. DOI: 10.3390/W9070534.

Kitajima, E. W.. (2020). An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, **20 (Biota Neotrop., 2020 20(2))**, e20190932. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2019-0932>

KITAJIMA, M.; SASSI, H.P.; TORREY, J.R. **Pepper mild mottle virus as a water quality indicator npj Clean Water** Nature Research, , 2018. Disponível em: <www.nature.com/npjcleanwater>. Acesso em: 6 jan. 2021

MAREE, H.J.; FOX, A.; RWAHNIH, M. AL; BOONHAM, N.; CANDRESSE, T. Application of hts for routine plant virus diagnostics: state of the art and challenges. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.1082, 2018. DOI: 10.3389/FPLS.2018.01082/BIBTEX.

NAKAMURA, K.; IWAI, M.; ZHANG, J.; OBARA, M.; HORIMOTO, E.; HASEGAWA, S.; KURATA, T.; TAKIZAWA, T. Detection of a Novel Recombinant Norovirus from Sewage Water in Toyama Prefecture, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis**, v.62, p.394–398, 2009.

NG, T.F.F.; CHEN, L.F.; ZHOU, Y.; SHAPIRO, B.; STILLER, M.; HEINTZMAN, P.D.; VARSANI, A.; KONDOV, N.O.; WONG, W.; DENG, X.; ANDREWS, T.D.; MOORMAN, B.J.; MEULENDYK, T.; MACKAY, G.; GILBERTSON, R.L.; DELWART, E.; PALESE, P. Preservation of viral genomes in 700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.111, p.16842–16847, 2014. DOI: 10.1073/PNAS.1410429111.

NG, T.F.F.; MARINE, R.; WANG, C.; SIMMONDS, P.; KAPUSINSZKY, B.; BODHIDATTA, L.; ODERINDE, B.S.; WOMMACK, K.E.; DELWART, E. High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. **Journal of Virology**, v.86, p.12161–12175, 2012. DOI: 10.1128/JVI.00869-12/ASSET/7D80F05B-AD0A-40B9-86C8-C75641383D59/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9990967910001.JPEG.

NIEUWENHUIJSE, D.F.; OUDE MUNNINK, B.B.; PHAN, M.V.T.; MUNK, P.; VENKATAKRISHNAN, S.; AARESTRUP, F.M.; COTTEN, M.; KOOPMANS, M.P.G. Setting a baseline for global urban virome surveillance in sewage the Global Sewage Surveillance project consortium. 2020. DOI: 10.1038/s41598-

020-69869-0.

PHAN, T.G.; KAPUSINSZKY, B.; WANG, C.; ROSE, R.K.; LIPTON, H.L.; DELWART, E.L. The Fecal Viral Flora of Wild Rodents. **PLOS Pathogens**, v.7, p.e1002218, 2011. DOI: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1002218.

ROBLEDO-MAHÓN, T.; SILVA-CASTRO, G.A.; KUCHAR, U.; JAMNIKAR-CIGLENEČKI, U.; BARLIČ-MAGANJA, D.; ARANDA, E.; CALVO, C. Effect of Composting Under Semipermeable Film on the Sewage Sludge Virome. **Microbial Ecology**, v.78, p.895–903, 2019. DOI: 10.1007/S00248-019-01365-Z/FIGURES/5.

ROOSSINCK, M.J.; MARTIN, D.P.; ROUMAGNAC, P. Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. 2015. DOI: 10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW.

ROSARIO, K.; NILSSON, C.; LIM, Y.W.; RUAN, Y.; BREITBART, M. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environmental Microbiology**, v.11, p.2806–2820, 2009. DOI: 10.1111/J.1462-2920.2009.01964.X.

ROSARIO, K.; SYMONDS, E.M.; SINIGALLIANO, C.; STEWART, J.; BREITBART, M. Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.7261–7267, 2009. DOI: 10.1128/AEM.00410-09.

SYMONDS, E.M.; NGUYEN, K.H.; HARWOOD, V.J.; BREITBART, M. Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. **Water Research**, v.144, p.1–12, 2018. DOI: 10.1016/J.WATRES.2018.06.066.

TAVARES-ESASHIKA, M.L. TESE: **CONSTRUÇÃO DO CLONE INFECCIOSO E VETOR VIRAL DE PEPPER RINGSPOT VIRUS**. 2021. 114p. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA,

YANG, Q.; RIVAILLER, P.; ZHU, S.; YAN, D.; XIE, N.; TANG, H.; ZHANG, Y.; XU, W. Detection of multiple viruses potentially infecting humans in sewage water from Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. **Science of The Total Environment**, v.754, p.142322, 2021. DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.142322.

ZHANG, T.; BREITBART, M.; LEE, W.H.; RUN, J.-Q.; WEI, C.L.; SOH, S.W.L.; HIBBERD, M.L.; LIU, E.T.; ROHWER, F.; RUAN, Y. RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. **PLOS Biology**, v.4, p.e3, 2005. DOI: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0040003.

Capítulo 1:

Metagenomic analyses of plant virus sequences in sewage water for plant viruses monitoring

Este capítulo foi publicado de forma modificada na revista *Tropical Plant Pathology*. Macária Ferreira Duarte, Ikaro Alves de Andrade, João Marcos Fagundes Silva, Fernando Lucas Melo, Ana Maria Machado, Alice Kazuko Inoue-Nagata, Tatsuya Nagata: **Metagenomic analyses of plant virus sequences in sewage water for plant viruses monitoring.**

1.1 Abstract

Frequent monitoring of emerging viruses of agricultural crops is one of the most important missions for plant virologists. A fast and precise identification of potential harmful viruses may prevent the occurrence of serious epidemics. Nowadays, high-throughput sequencing (HTS) technologies became an accessible and powerful tool for this purpose. The major discussion of this strategy resides in the process of sample collection, which is usually laborious, costly and nonrepresentative. In this study, we assessed the use of sewage water samples for monitoring the widespread, numerous, and stable plant viruses using HTS analysis and RT-qPCR. Plant viruses belonged to 12 virus families were found, from which *Virgaviridae*, *Solemoviridae*, *Tymoviridae*, *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Closteroviridae* and *Secoviridae* were the most abundant ones with more than 20 species. Additionally, we detected one quarantine virus in Brazil and a new tobamovirus species. To assess the importance of the processed foods as virus release origins to sewage, we selected two viruses, the tobamovirus pepper mild mottle virus (PMMoV) and the carlavirus garlic common latent virus (GarCLV), to detect in processed food materials by RT-qPCR. PMMoV was detected in large amount in pepper-based processed foods and in sewage samples, while GarCLV was less frequent in dried and fresh garlic samples, and in the sewage samples. This suggested a high correlation of virus abundance in sewage and processed food sources. The potential use of sewage for a virus survey is discussed in this study.

Keywords: Wastewater; Virome; High-throughput sequencing

1.2 Introduction

Pepper mild mottle virus (PMMoV) is a typical tobamovirus, with a single-stranded RNA genome and rod-shaped viral particles. Despite being a plant virus, it is one of the most abundant viruses in human fecal samples (Zhang et al. 2005; Nakamura et al. 2009). PMMoV particles are highly stable, preserving infectivity even after purification from human feces (Zhang et al. 2005). PMMoV has been considered as an useful indicator of human fecal contamination in various settings of urban wastewater worldwide (Rosario et al. 2009; Symonds et al. 2018; Kitajima et al. 2018; Gyawali et al. 2019; Bonanno Ferraro et al. 2021). In contrast, bacterial indicators, such as coliform bacteria, are known as less stable indicators of fecal contamination, due to false positive results (Brownell et al. 2007). In addition to PMMoV, other tobamoviruses and tymoviruses have also been found in human fecal samples in a reasonably high amount, being potential indicators (Zhang et al. 2005; Nakamura et al. 2009). As such, the detection of plant viral genome fragments in sewage water has already been reported by using the high-throughput sequencing (HTS) technology (Cantalupo et al. 2011; Ng et al. 2012; Bačnik et al. 2020). Since 2014, we have been conducting projects to study gastroenteritis viruses in sewage water and have discovered a significant amount of plant virus genomes in our analyses. These findings suggest that sewage virome analysis could be a valuable tool for conducting surveys on plant viruses.

In this study, we analyzed the plant virus genome fragments identified in raw sewage water collected at the Sewage Treatment Plant in Brasilia, Brazil, using the HTS approach. To understand the importance of the processed foods

as virus release origins to sewage, PMMoV and garlic common latent virus (GarCLV) were chosen for detection by RT-qPCR in the processed and fresh food materials as well as in the sewage samples. The significance of the results of the sewage virome analyses, and the potential use of the metagenomic data for surveys on plant viruses are discussed.

1.3 Material and Methods

1.3.1 Sample preparation and HTS

Raw sewage water was collected at the Sewage Treatment Plant (ETE-Norte) in Asa Norte, Brasilia, Brazil. Samplings were performed four times in different periods: March and May of 2016 (referred as S16-03 and S16-05), and May and August of 2020 (S20-05 and S20-08). The samples (300 mL each) were immediately cooled on ice, transported to the laboratory, and a virus semi-purification protocol was employed for virus enrichment, since virus genomes were expected at low concentration in sewage water. Briefly, sewage water was centrifuged at $5000 \times g$ for 20 min. The supernatant was transferred to an ultracentrifuge tube on top of a 20% sucrose cushion, and centrifuged at $140000 \times g$ for 60 min. The pellets were resuspended in ultrapure water and stored at $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$; or in resuspension buffer of Quick-RNA Fecal/Soil Microbe Microprep Kit (Zymo Research, Irvine, USA) for RNA extraction, according to the manufacturer's instructions. The cDNA libraries (one library for each sample, in a total of four libraries) were constructed after bacterial rRNA removal (Illumina San Diego, USA) at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea), and HTS was performed using HiSeq 4000 (samples for 2016) or NovaSeq 6000

(samples for 2020) with 100 bp paired-end in a 5G scale for each library at Macrogen Inc.

Raw reads were initially processed using BBDuk program of BBDuk package (Bushnell et al. 2017) to remove low-quality sequences. After trimming, two approaches were used to analyze the plant virus sequences. The first one employed the taxonomic classification program for metagenomics “Kaiju” (Menzel et al. 2016) for the reads classification, performed with default parameters in Linux OS (<https://github.com/bioinformatics-centre/kaiju.git>) using a Viral Genome RefSeq database, and visualized by Krona viewer (<https://github.com/marbl/Krona/wiki/KronaTools>) in Linux OS. The second approach consisted in performing *de novo* assembly of reads using the MEGAHIT assembler (<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/10/1674/177884?login=false>) with k-mer of 119. These contigs were exported to Geneious software v.11.0.5 (Dotmatics, Windhill, UK) and the contigs corresponding to virus genomes were identified by BLASTx searches against the RefSeq database of virus genomes in Geneious.

1.3.2 Virus genome sequence assembly and phylogenetic analysis

Contigs identified as plant viruses were extended by the “map to reference” command of the Geneious software using the reads (reads mapping to the contigs) to assemble the near-complete genomes. For phylogenetic analyses, the genomes were aligned with ClustalW in the Geneious software with relevant virus sequences and the phylogenetic trees were constructed using MEGA11

program (Tamura et al. 2021) using the Maximum Likelihood method and General Time Reversible model.

1.3.3 RT-qPCR

To assess the importance of the processed foods as virus release origins to sewage, we selected two viruses, PMMoV (tobamovirus) and GarCLV (carlavirus), to detect in processed food materials by RT-qPCR. The confirmation of the presence of these two viruses was done by RT-qPCR in the original sewage water and in processed and fresh food materials bought in the local market in Brasilia. Potential sources of PMMoV tested were chili pepper sauces, dried pepper flakes, paprika powder, and fresh chili pepper (Malagueta type, *Capsicum frutescens*); and of GarCLV dried garlic flakes and fresh cloves. RNA was extracted from the plant samples using total RNA purification kit (Cellco, São Carlos, Brazil). Total RNA of 500 ng from those materials was subjected to reverse transcription (RT) using SuperScript IV enzyme (Thermo Fisher, Waltham, USA) with a mixture of oligo-dT and random primers. One microliter of 20 µL of RT reaction solution was subjected to quantitative PCR (qPCR) using GoTaq® dye-based qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA), with the primers listed in Supplementary Table 1. For absolute quantification of the amplicons, we used the cDNA clone of PMMoV (Junqueira et al., 2014) and the PCR product of GarCLV amplified by primers GarCLV_Control_4341_For and -4809_Rev (Supplementary Table 1) with a series of decimal dilutions ranging from 1 to 0.001 ng per tube as standards. The copy numbers were calculated by the molecular weight of each DNA fragments.

Supplementary Table 1. Primers used for RT-qPCR

Primer names	Primer sequences
PMMoV_1911_qPCR_For	CGAAGCAAATGTGCGCACTTG
PMMoV_2135_qPCR_Rev	ATCGTCTCTGTGGATACCA
GarCLV_Control_4809_Rev	GCAATCTTTTCCTAGCACCCAT
GarCLV_Control_4341_For	CTTGGGCGTTTCCTCACTTG
GarCLV_4647_qPCR_For	ACGTGGATGAAGCTCTGCAA
GarCLV_4768_qPCR_Rev	AGCCCATACGCTTTTTCACGA

1.4 Results

Sewage samples were analyzed by HTS as a surveillance tool for plant viruses. Four samples were collected, in 2016 and 2020. First, the Kaiju analysis showed that in S16-03 sample (March, 2016) a total of 562,993 (out of 55,495,060) reads were classified as virus sequences, being ~14% (77,634 reads) identified as plant viruses; for S16-05 sample (May, 2016), 483,461 (out of 52,780,636) reads classified as virus sequences, and ~8% (40,775 reads) as plant viruses; for S20-05 (May, 2020), of the 537,608 (out of 57,649,960) virus reads ~8% (44,443 reads) classified as plant viruses; and for S20-08 (August, 2020) sample, ~9% (70,698) of the reads classified as plant viruses, from a total of 785,413 (out of 73,676,392) virus reads. On average, approximately 10% of the viral reads belonged to plant viruses, suggesting that they were present in a high amount in sewage water.

Further, analyses performed by the Kaiju software showed that in S16-03 sample 46% (35,938 reads) of the plant virus reads corresponded to viruses in the family *Virgaviridae*, 30% (23,379) to *Solemoviridae* and 8% (5,965) to *Tymoviridae* (Fig. 1). In the sample S16-05, the analysis showed that 43% (17,755) of the plant virus reads were classified as members of *Solemoviridae*, 35% (14,272) of *Virgaviridae*, and 10% (3,887) of *Betaflexiviridae* (Fig. 1). For the analysis performed with sample of S20-05, 23% (10,209) were classified as members of *Alphaflexiviridae*, 22% (9,679) as *Tymoviridae*, and 18% (7,796) as *Virgaviridae* (Fig. 1). In S20-08 sample, the reads of 36% (25,425) were of *Virgaviridae*, 22% (15,178) of *Alphaflexiviridae*, and 10% (6,164) of *Tombusviridae* (Fig. 1). In general, members of genus *Tobamovirus* were the most abundant, followed by those of *Sobemovirus*, *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Tymovirus* and *Closterovirus*.


Family	Genus	S16-03	S16-05	S20-05	S20-08	Number of reads
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	211	167	1,557	1,522	0  >1,000
	<i>Potexvirus</i>	3,174	271	8,652	13,656	
<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Foveavirus</i>	23	29	15	34	
	<i>Carlavirus</i>	3,222	3,858	2,526	5,130	
<i>Bromoviridae</i>	<i>Ilarvirus</i>	5	1	15	5	
	<i>Cucumovirus</i>	27	29	133	214	
<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus</i>	18	24	122	89	
	<i>Crinivirus</i>	32	21	9	16	
	<i>Closterovirus</i>	1,167	1,217	2,070	6,544	
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	2	3	10	41	
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	376	317	385	3,055	
<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	12	4	13	22	
	<i>Comovirus</i>	304	172	933	922	
<i>Solemoviridae</i>	<i>Polerovirus</i>	67	47	62	125	
	<i>Sobemovirus</i>	23,312	17,708	877	1,008	
<i>Tombusviridae</i>	<i>Macanavirus</i>	4	4	28	67	
	<i>Luteovirus</i>	5	4	0	3	
	<i>Alphacarmovirus</i>	8	11	5	29	
	<i>Umbravirus</i>	9	6	18	37	
	<i>Tombusvirus</i>	17	4	1	42	
	<i>Aureusvirus</i>	44	16	38	287	
	<i>Pelarspovirus</i>	63	26	79	151	
	<i>Betacarmovirus</i>	94	38	123	215	
	<i>Machlomovirus</i>	184	60	327	593	
	<i>Gammacarmovirus</i>	272	394	2,038	1,745	
	<i>Panicovirus</i>	598	208	2,383	2,995	
	<i>Tospoviridae</i>	<i>Orthospovirus</i>	12	8	1	
<i>Tymoviridae</i>	<i>Maculavirus</i>	35	26	392	389	
	<i>Tymovirus</i>	5,930	722	9,287	1,257	
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobravirus</i>	7	6	7	28	
	<i>Tobamovirus</i>	35,931	14,266	7,789	25,397	

Figure 1.1: A heatmap table showing the taxonomic classification of plant virus reads identified by the Kaiju software in raw sewage samples of March and May 2016, and May and August 2020. Bluish color background indicates higher numbers of reads in the category.

BLASTx searches of the contigs assembled by MEGAHIT showed that in samples collected in 2016 (Fig. 2a), viruses of nine plant virus families were identified, particularly those of *Betaflexiviridae* (25%), *Alphaflexiviridae* (17%), *Closteroviridae* (16%), and *Virgaviridae* (14%). In 2020, also nine plant families were identified (Fig. 2b): *Alphaflexiviridae* (26%), *Betaflexiviridae* (15%), *Virgaviridae* (15%), and *Secoviridae* (12%) (Fig. 2b).

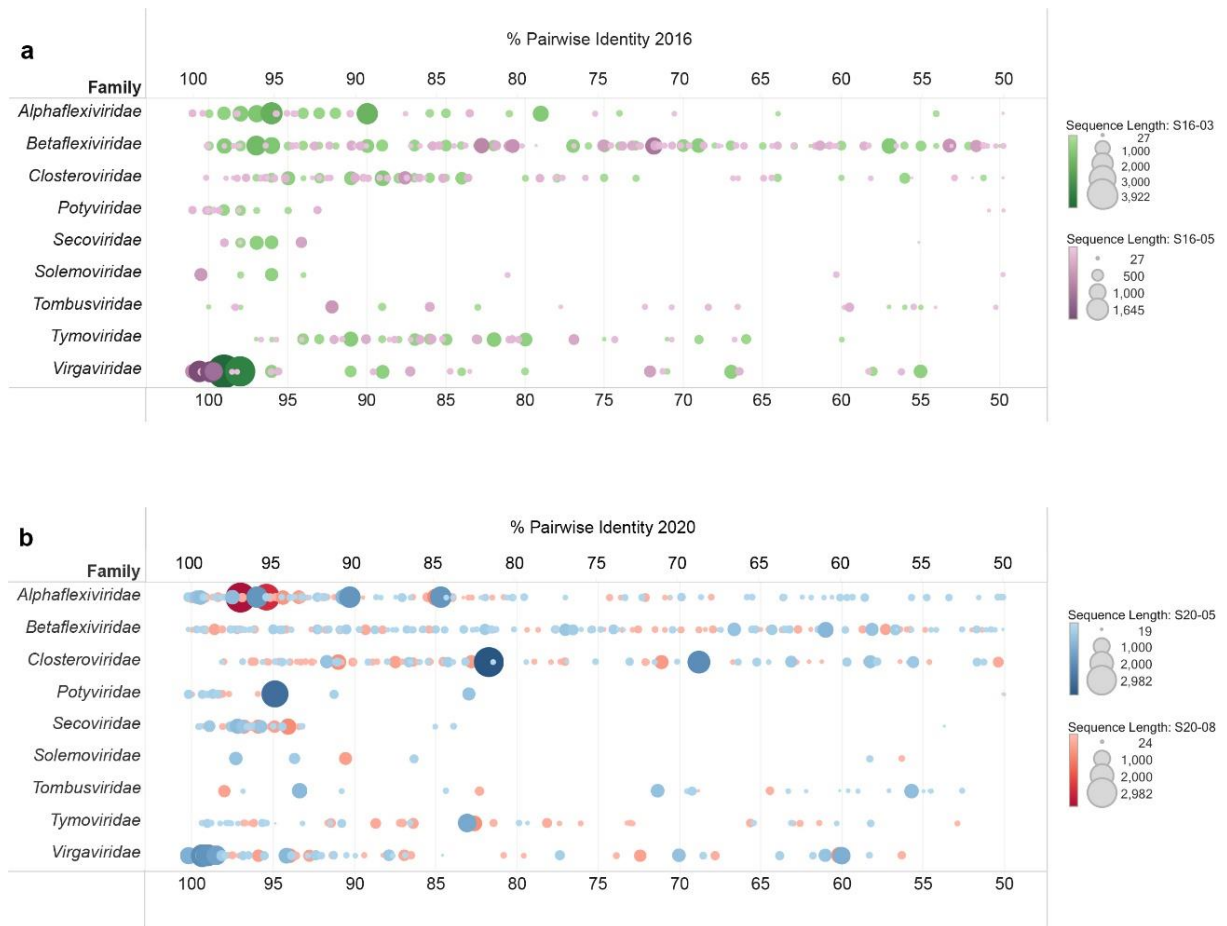


Figure 1.2: Amino acid sequence identity distribution of plant virus-related contig sequences from sewage samples collected in 2016 (a) and 2020 (b). The assembled sequences were compared to sequences in the BLASTx protein database. One spot represents one contig, and the coverage length is indicated by the spot size. Nine families were detected.

For the species classification analysis, the threshold limit of 90% amino acid identity to the reference sequence was considered for the sake of simplicity. The identities were confirmed manually and individually, analyzing BLASTx alignments to exclude errors in the identification. Short contig alignment with the size less than 100 aa were not considered to eliminate possible false positive. Some contigs showed lower query coverages with translated query sequences by BLASTx due to the alignment to the read-through domains of the reference sequence (e.g., melon necrotic spot virus,

MNSV, in Table 1); in other cases, the contig region was adjacent to two ORFs, resulting in split of coverage for two ORFs (resulting in lowering coverage). In all cases, the BLASTn analysis confirmed >90% coverage with high identities. A total of 25 plant virus species were identified in the samples collected in 2016 (Table 1). The same viruses were present in 2020, except for two potexviruses, Cymbidium mosaic virus and Schlumbergera virus X (Table 1). It is important to note that the number of contig hits with known viruses was not correlated with the abundance of the virus genomic fragments in the sewage samples. For example, in the sample S20-05 (May, 2020), GarCLV had 18 contig hits, but only 914 reads (mean coverage of 10.7 to the whole genome) were mapped to the genome. On the other hand, PMMoV had 5 contig hits, but 6,003 reads (mean coverage of 95.3) were mapped.

Interestingly, four viruses were recently first reported in Brazil: garlic latent virus (Da Silva et al., 2019), MNSV (Moura et al., 2018), tobacco mild green mottle virus (Favara et al. 2019), and tomato mottle mosaic virus (Nagai et al. 2018). Since these viruses were detected in the sewage samples of 2016, it implies that these viruses were already circulating before their first reports. Notably for MNSV, it was listed as a quarantine virus by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) in Brazil before the first report in 2018. MNSV was detected in both years, 2016 and 2020, suggesting that it might be widespread in the country. Given the importance of this virus, the near-complete genomes were assembled (accession numbers LC745663-LC745666) using reads of the four HTS data and a phylogenetic tree was constructed after alignment with all the 29 full-length genome sequences of MNSV. All four Brazilian MNSV sequences clustered together showing that the

same lineage of MNSV was present since 2016. They were closely related with the isolates from North America and Spain (Fig. 3a).

Using the HTS analysis on sewage water, we discovered two other viruses still not reported in Brazil, and named virus A and virus B (Table 1). Due to the Brazilian MAPA regulation, the publication of pests for the first time in Brazil must be preceded by its official communication to the MAPA. This procedure was not done yet, because the host and the location of the incidence are not known. Based on this situation and considering the scope of this study, we report the detection of these viruses omitting their identification. The virus A and virus B are two known viruses, and virus B is a quarantine virus in Brazil. We are currently searching the host plants of these viruses.

In addition to the 25 viruses, a potential novel virus was found in our datasets. Its genome organization and the phylogenetic relationship suggest that this novel virus is a member of the genus *Tobamovirus*. It was provisionally named as sewage-associated tobamovirus, acronym SaTV, accession number LC745662. The near-complete assembled genome is 6,777 nucleotides-long and presents unique tobamoviral genome organization. Its sequence was aligned with tobamovirus complete genome sequences, and a phylogenetic tree was constructed (Fig. 3b). Maracuja mosaic virus (MarMV) and passion fruit mosaic virus (ParMV) were most related tobamovirus to SaTV. SaTV has a cysteine-rich protein gene (Fig. 3c) which is unique for SaTV, MarMV and ParMV in *Tobamovirus* genus. As the sequence is highly related to passion fruit tobamoviruses, we are searching for the viruses at first in these plants.

In the data sets, other sequences were found that share <90% amino acid identities with known viruses. They are listed in Supplemental Tables 2 (identity of 80.0-89.9%) and 3 (70.0-79.9%). It implies that these sequences are from potentially new virus species or new variants, according to the taxonomical criteria, and that a thorough analysis is required for their classification.

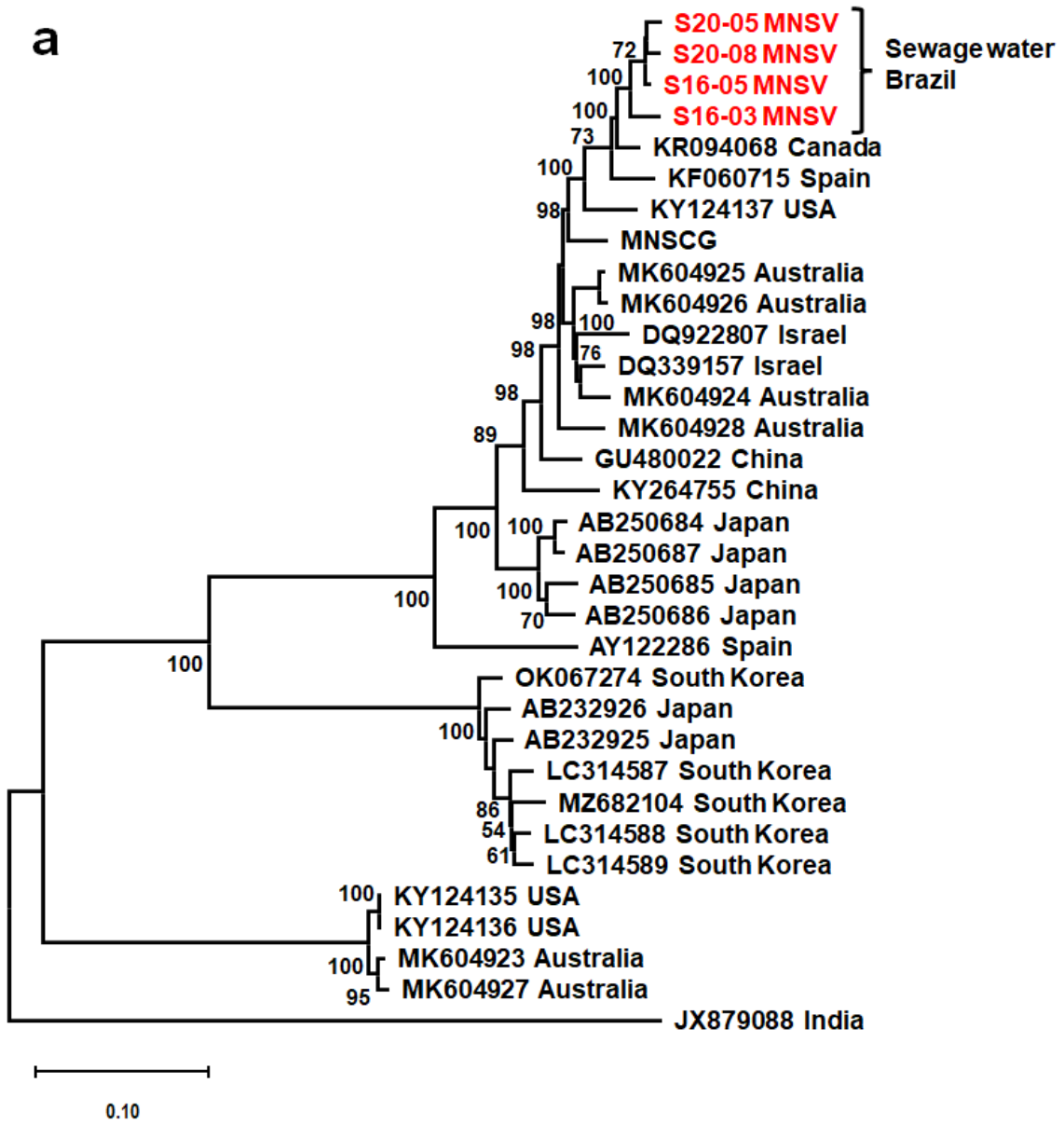
Table 1.1: BLASTx analysis of HTS obtained contigs for virus identification with amino acid sequence identities above 90%.

Family	Genus	Virus	% Pairwise identity	E-value	% Query coverage	Number of contigs (Alignment coverage in amino acid)			
						S16-03	S16-05	S20-05	S20-08
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	garlic virus A	90.5-100.0	0 ~ 9.80e-94	38.4-99.8	2 (115-248)	1 (100)	13 (102-690)	8 (107-786)
		Cactus virus X	90.0-100.0	0 ~ 7.26e-77	70.3-99.9	4 (110-1,544)	4 (118-200)	7 (110-1,543)	1 (1430)
	<i>Potexvirus</i>	Cymbidium mosaic virus	92.3-99.1	1.31e-108 ~ 5.36e-68	99.4-99.6	3 (106-174)	0	0	0
		Schlumbergera virus X	98.2-100.0	2.62e-64 ~ 4.43e-72	99.7-100.0	2 (113-200)	0	0	0
		Zygocactus virus X	90.1-100.0	0 ~ 9.79e-81	53.4-100.0	8 (110-1,544)	4 (126-188)	19 (112-1,425)	7 (106-1,546)
<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	cole latent virus	91.7-99.1	1.52e-119 ~ 9.52e-52	59.4-99.6	2 (138-145)	1 (179)	2 (104-179)	1 (213)
		cowpea mild mottle virus	91.7-94.9	0 ~ 3.92e-96	61.8-82.5	0	1 (288)	1 (188)	1 (137)
		garlic common latent virus	91.8-100.0	0 ~ 9.51e-86	53.9-99.9	14 (101-203)	0	16 (104-291)	7 (108-329)
		garlic latent virus	90.0-99.0	0 ~ 8.03e-72	88.5-99.8	2	2	3	11

						(126-220)	(106-134)	(106-264)	(104-331)
		melon yellowing-associated virus	90.0-99.2	0 ~ 6.14e-61	71.4-100.0	6 (100-743)	8 (107-238)	8 (107-238)	2 (162-212)
		potato virus M	90.2-96.1	0 ~ 6.00e-91	99.3-100.0	1 (137)	1 (357)	2 (103-114)	3 (149-220)
Closteroviridae	<i>Closterovirus</i>	citrus tristeza virus	90.0-99.2	0 ~ 9.75e-103	52.5-100.0	8 (116-376)	15 (101-331)	29 (101-412)	7 (101-594)
Potyviridae	<i>Potyvirus</i>	zucchini yellow mosaic virus	92.3-100.0	0 ~ 8.66e-72	91.3-99.9	9 (108-279)	8 (108-265)	14 (111-265)	7 (103-323)
Secoviridae	<i>Comovirus</i>	squash mosaic virus	93.0-99.4	0 ~ 8.81e-71	64.0-100.0	8 (104-379)	2 (268-452)	17 (131-666)	24 (104-547)
Solemoviridae	<i>Sobemovirus</i>	papaya lethal yellowing virus	96.5-99.5	0	80.1-99.7	1 (600)	0	0	0
		southern bean mosaic virus	90.5-98.3	0 ~ 9.52e-125	59.0-99.7	2 (116-175)	0	0	1 (420)
Tombusviridae	<i>Gammacarmovirus</i>	melon necrotic spot virus	91.4-100.0	0 ~ 5.34e-56	55.8-99.3	1 (101)	2 (193-614)	2 (193-497)	1 (787)
Tymoviridae	<i>Tymovirus</i>	tomato blistering mosaic virus	90.8-97.2	0 ~ 9.23e-179	53.0-99.9	6 (107-343)	5 (105-288)	6 (105-304)	0
Virgaviridae	<i>Tobamovirus</i>	Virus A	91.1-97.9	0 ~ 7.33e-	99.0-100.0	1	3	6	3

		105		(315)	(112-225)	(112-498)	(237-273)	
pepper mild mottle virus	93.6-100.0	0 ~ 9.21e-148	50.7-99.7	4 (154-1,205)	2 (532-1,168)	5 (128-1,612)	1 (1,612)	
tobacco mild green mosaic virus	94.0-99.7	0 ~ 3.57e-84	62.8-99.8	1 (111)	0	4 (130-697)	2 (785-816)	
tobacco mosaic virus	91.0-100.0	0 ~ 9.50e-67	57.2-100.0	7 (115-576)	0	8 (103-208)	14 (102-365)	
tomato mosaic virus	98.9-99.0	0	75.0-76.3	1 (1,605)	1 (1,605)	1 (1,612)	1 (1,605)	
tomato mottle mosaic virus	95.9-100.0	0 ~ 5.25e-103	54.5-100.0	1 (1,605)	0	4 (108-651)	2 (199-1,290)	
Quarantine virus	Virus B	99.6-100.0	0 ~ 6.42e-98	68.9-99.8	1 (1,648)	1 (1,645)	1 (1,645)	1 (147)

a



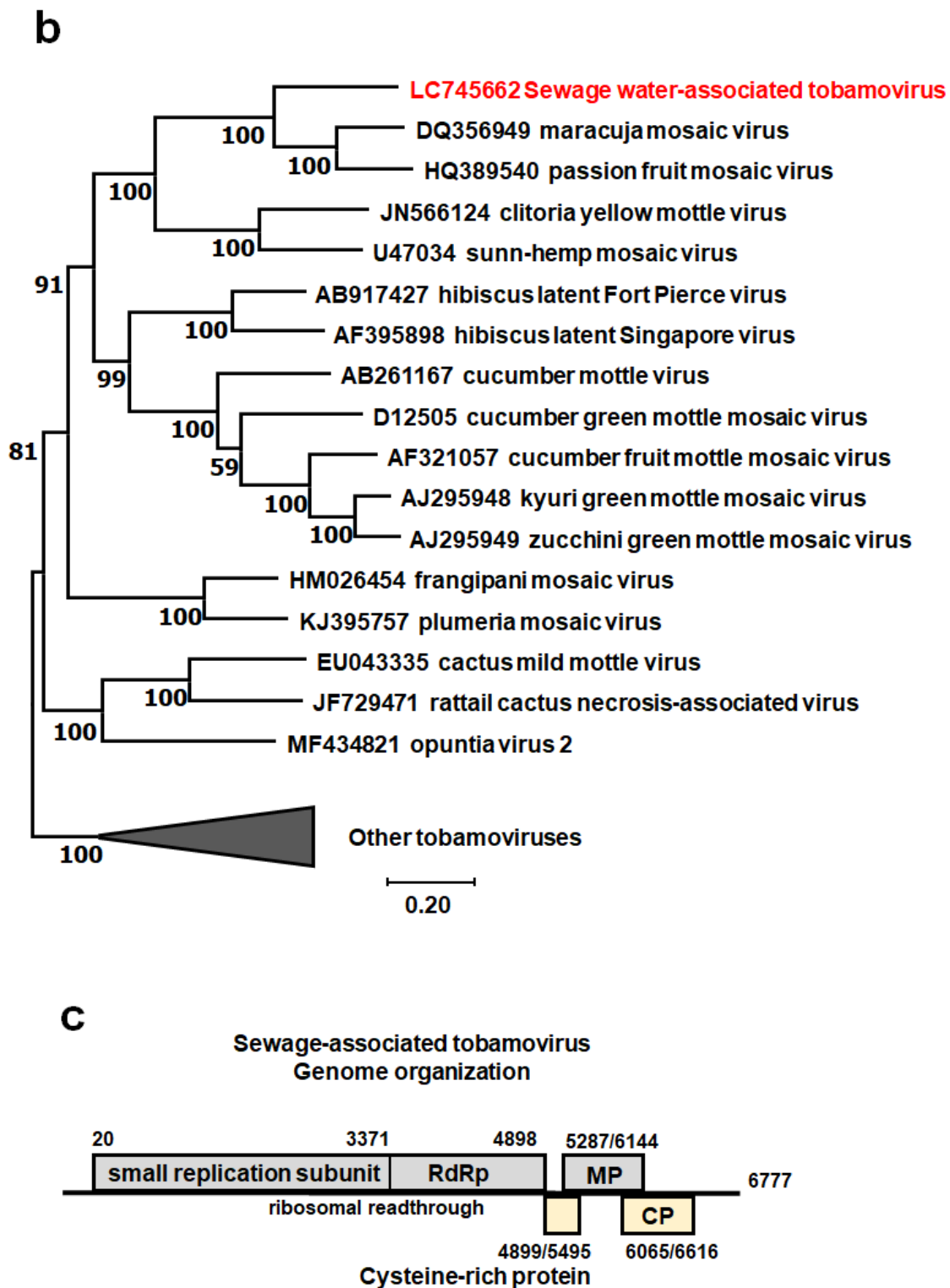


Figure 1.3: Analyses of the melon necrotic spot virus (MNSV) and sewage-associated tobamovirus sequences obtained by HTS. Phylogenetic trees were constructed based on the maximum-likelihood method using MEGA11, for MNSV sequences (a); and for sewage-associated tobamovirus sequence aligned with tobamoviruses (b). c. Genome organization of sewage-associated tobamovirus with position of each ORF (above or below) and gene name. Accession numbers are indicated. For MNSV sequences, the isolated country is also indicated.

For validation of the HTS obtained genome sequences, we hypothesized that processed foods would be important virus sources to sewage/wastewater. For testing this hypothesis, two viruses, PMMoV and GarCLV, were chosen and RT-qPCR were performed using RNA extracted from the processed foods and from fresh materials, as well as from the sewage samples collected in 2020. These viruses were chosen because chili and garlic are often consumed as processed foods. Chili dried flakes, chili pepper sauce, paprika powder and fresh malagueta pepper fruits (*Capsicum frutescens*) were used to detect the tobamovirus PMMoV, and garlic dried flakes and fresh cloves were used to detect GarCLV. Remarkably, we detected PMMoV in the sewage sample, and in all types of processed food materials and fresh pepper (Table 2), including the chili pepper sauce which contains vinegar, and hence the sauce has a low pH of 3~4. This indicated that PMMoV is abundant and stable in the processed foods.

The presence of GarCLV was confirmed in the sewage, but in a low amount, and only in one of the two samples (Table 2). In contrast, it was found in higher amount in dried flakes. In the fresh garlic sample, the virus was not detected. In general, GarCLV was less abundant than PMMoV.

Table 1.2: Amount expressed in copy numbers of PMMoV and GarCLV detected by RT-qPCR.

Sample type	Sample	Number of copies in total RNA from 1 mL (sewage water) or 1 ng (plant material)	
		PMMoV detection	GarCLV detection
Sewage water	S20-08	11,120,384	28
	S20-05	1,213,928	0
Fresh chili pepper	<i>Capsicum frutescens</i> (Malagueta)	2,580	nt
Chili pepper flakes (dried)	Supplier L	47,456	nt
	Supplier KS	67,138	nt
Paprika powder	Supplier L	350,598	nt
	Supplier K	4,293,756	nt
Chili pepper sauce	Supplier KN	418	nt
	Supplier C	2,002	nt
Garlic flakes (dried)	Supplier L	*nt	4,156
	Supplier K	nt	2,114
Fresh garlic	Supplier A	nt	0
	Supplier B	nt	0

*nt = not tested. Single sample was used for each supplier.

1.5 Discussion

In our study, viruses of the plant virus families *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Closteroviridae*, *Secoviridae*, *Solemoviridae*, *Tombusviridae*, *Tymoviridae*, and *Virgaviridae* were the most commonly found in sewage samples, confirming previous studies (Cantalupo et al. 2011; Ng et al. 2012; Fernandez-Cassi et al. 2018; Martínez-Puchol et al. 2020). We believe, though, that the abundance of these viruses in sewage samples are not completely correlated with their incidence in the fields. At least two aspects should be considered for this analysis. (1) The first aspect is related to virus stability. Tospoviruses, which are very common pathogens of tomato and zucchini plants in Brazil, were rarely identified in sewage samples (Fig. 1). The viruses of this group have virus particles with a lipid membrane, and thus are likely fragile in the wastewater environmental condition and in the human digestive tract, resulting in rapid degradation. Therefore, viruses with high stability are expected to be preserved for a longer time in the sewage water condition. On the other hand, the property of particle stability may not be a general characteristic of a genus or a family. For example, zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) was a potyvirus frequently detected in our sewage samples (Table 1). However, other potyviruses that infect cucurbit plants, such as watermelon mosaic virus and papaya ringspot virus-W (Supplementary Table 2), two other important potyviruses for cucurbits in Brazil, were rarely detected. Furthermore, other common potyviruses, such as potato virus Y and pepper yellow mosaic virus in solanaceous plants were not detected in our sewage samples. Thus, it is possible that ZYMV may have unique feature in particle stability among potyviruses. (2) The second condition is the productivity of the infected plants. Tospoviruses cause severe symptoms and, hence, a drastic

reduction in leaf and fruit production (hence lower circulation of infected crop in market), while PMMoV is known to cause mild symptoms in pepper plants. It implies that viruses that cause mild or no symptoms will stay more in food materials, then released more in the sink or ingested/dispersed in the sewage.

Our results open important questions about the potential use of sewage water analysis for plant virus surveys, as discussed in Bačnik et al. (2020). For example, the presence of MNSV in sewage was detected since 2014, when we started analyzing sewage virome by HTS (data not shown). In the present study, we found MNSV genomic fragments in the samples of 2016 and 2020. The natural occurrence of MNSV in Brazil was firstly reported only in 2018 (Moura et al. 2018), and thus removed from the list of quarantine virus in Brazil. When a new virus is found in a sewage sample, it suggests that the virus may be present in the food, and consequently in commercial fields. Therefore, we are now trying to find the virus A and the virus B in plants to confirm their natural occurrence in Brazil. The virus B is currently listed as a quarantine virus in Brazil, and it has been found in our sewage samples of 2016 and 2020, and also in another sample collected in 2014 (data not shown). However, we should be aware about the possibility that this virus' genome fragments are present in imported (processed) foods.

In order to demonstrate the efficiency of the method for identifying circulating viruses, we selected two viruses, PMMoV and GarCLV, for detection and quantification by RT-qPCR in the processed foods, as test cases. Interestingly, the amount of PMMoV found in the processed foods as well as in sewage samples was extremely high, implying in the high stability of the particles in *in vitro* conditions. The virus was detected in all samples, chili pepper (*C. frutescens*), flakes (usually made

of Dedo-de-moça type chili, *C. baccatum*), paprika (*C. annuum*), and chili sauce (usually made of chili *C. chinense* and *C. frutescens*), indicating that PMMoV occurs widely in many pepper types. Surprisingly, we were able to detect PMMoV in the chili pepper sauce, which is very acid (pH 3~4). Although high amounts of PMMoV was found in sewage water, we do not believe that PMMoV is waterborne virus. We tried to inoculate the semi-purified virus solution from sewage water in *Nicotiana benthamiana* plants (highly susceptible host of PMMoV), but the plants were not infected (data not shown).

Bačnik et al. (2020) reported that PMMoV, tomato mosaic virus, and tobacco mild green mosaic virus, all belonging to the *Tobamovirus* genus, were successfully recovered via mechanical inoculation of concentrated wastewater fractions in *N. benthamiana* and *N. occidentalis* plants. In contrast, inoculation with non-concentrated wastewater did not result in infections. Although these tobamoviruses exhibit infectivity, the viruses present in sewage are unlikely to serve as a source of new plant infections. Nevertheless, further surveys are necessary to explore the possibility of tobamoviruses being water-borne.

One of the great advantages of the plant virus study by using the sewage water source is the sample collection process. Visiting the production fields is laborious, and costly, especially in a continental country like Brazil. The collection may not represent the overall diversity of plants and localities. The use of sewage water, on the other hand, may provide the collection of plant samples from multiple sources that were produced in many different areas.

Epidemiological studies based on sewage samples have a potential to predict the onset of human viral diseases (Xagorarakis and O'Brien 2020), including SARS-CoV2 that caused an important pandemic in 2020-2021 (Bonanno Ferraro et al. 2022). Here, we demonstrate the validity of the use of sewage samples to predict or confirm outbreaks or emergence of plant viral diseases. Furthermore, the sewage water analysis may contribute to a phytosanitary alert by monitoring the presence of pathogenic plant viruses, for those viruses with stable particles in environmental water samples. It is worth mentioning that there are limitations on the use of plant virus metagenomic data in sewage samples for plant virus survey and extreme care is needed for interpretation of the results.

Supplementary files

Supplementary Table 1. Primers used for RT-qPCR

Primer names	Primer sequences
PMMoV_1911_qPCR_For	CGAAGCAAATGTCGCACTTG
PMMoV_2135_qPCR_Rev	ATCGTCTCTGTGGATACCA
GarCLV_Control_4809_Rev	GCAATCTTTTCCTAGCACCCAT
GarCLV_Control_4341_For	CTTGGGCGTTTCCTCACTTG
GarCLV_4647_qPCR_For	ACGTGGATGAAGCTCTGCAA
GarCLV_4768_qPCR_Rev	AGCCCATACGCTTTTCACGA

Supplementary Table 2. Possible plant virus species identified by BLASTx with amino acid sequence identity above 80-89.9%.

Family	Genus	Possible virus species	% Pairwise identity	E-value	% Query coverage	Number of contigs			
						S16-03	S16-05	S20-05	S20-08
Alphaflexiviridae	<i>Allexivirus</i>	garlic virus A	80.5-88.5	1.31e-70 ~ 6.06e-60	80.9-99.7	1	1	2	2
		Cactus virus X	84.5- 86.9	0 ~ 4.70e-63	66.8- 99.8	1	1	0	1
		Cymbidium mosaic virus	86.6	4.87e-74	99.8	1	0	0	0
	<i>Potexvirus</i>	Zygocactus virus X	80.4- 86.4	1.32e-177 ~ 8.52e-139	45.6- 99.9	0	1	3	2
		cowpea mild mottle virus	80.3- 89.2	0 ~ 6.38e-176	33.45-99.8	2	1	0	1
		garlic common latent virus	85.2- 88.3	1.77e-64 ~ 4.71e-53	98.7-99.6	1	1	2	1
		garlic latent virus	80.0- 89.7	0 ~ 8.34e-50	70.7-100.00	2	5	0	8
		melon yellowing-associated virus	80.5- 89.3	0 ~ 8.45e-91	90.9-99.9	1	4	0	5
		potato virus M	81.3- 89.7	0 ~ 8.36e-153	30.5-99.6	6	3	3	6
Closteroviridae	<i>Closterovirus</i>	citrus tristeza virus	80.5- 89.8	0 ~ 9.58e-68	21.4-100.0	15	15	16	13
Potyviridae	<i>Potyvirus</i>	Papaya ringspot virus	82.8	0	99.94	0	0	0	1
Secoviridae	<i>Comovirus</i>	squash mosaic virus	83.7- 84.9	2.15e-58 ~ 8.05e-81	99.6-100.0	0	0	0	2
Solemoviridae	<i>Sobemovirus</i>	papaya lethal yellowing virus	80.6	4.92e-64	97.9	1	0	0	0
		southern bean mosaic virus	86.2	7.39e-163	69.27	0	0	0	1

<i>Tombusviridae</i>	<i>Gammacarmovirus</i>	melon necrotic spot virus	82.3- 89.9	0 ~ 2.82e-138	88.0-100.0	2	1	1	0
<i>Tymoviridae</i>	<i>Tymovirus</i>	tomato blistering mosaic virus	80.3- 89.4	0 ~ 9.81e-83	48.8-100.0	13	7	7	1
		Virus A	80.1- 89.8	0 ~ 8.33e-80	47.6-99.8	4	3	2	1
		pepper mild mottle virus	89.4- 89.8	0 ~ 8.33e-77	99.5-99.6	1	0	0	0
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>	tobacco mild green mosaic virus	80.8	1.17e-69	47.7	0	0	1	0
		tobacco mosaic virus	84.1- 89.8	1.24e-52 ~ 8.91e-61	48.1-99.7	0	1	0	2
		tomato mosaic virus	84.4	6.75e-09	14.8	0	0	0	1
	Quarantine virus	Virus B	87.8	6.57e-55	100.0	0	0	0	1

Supplementary Table 3. Possible plant virus species identified by BLASTx with amino acid sequence identity above 70-79.9%.

Family	Genus	Possible virus species	% Pairwise identity	E-value	% Query coverage	Number of contigs			
						S16-03	S16-05	S20-05	S20-08
Alphaflexiviridae	<i>Allexivirus</i>	garlic virus A	73.6-76.9	2.22e-55 ~ 2.62e-49	99.7	0	0	1	1
		Cactus virus X	70.3-79.9	0 ~ 3.16e-80	43.6-99.9	1	2	1	0
		Zygocactus virus X	72.1	1.04e-127	93.98%	0	0	1	0
	<i>Potexvirus</i>	cowpea mild mottle virus	70.0-78.7	1.33e-90 ~ 8.99e-56	97.3-99.4	0	0	1	2
		garlic common latent virus	76.9-79.7	0 ~ 3.36e-51	71.1-99.9	0	1	1	1
		garlic latent virus	70.4-76.7	1.28e-53 ~ 8.43e-36	37.6-99.9	3	4	2	6
		melon yellowing-associated virus	71.5-78.8	0 ~ 8.39e-70	58.5-100.0	5	7	0	2
		potato virus M	70.3-77.4	0 ~ 6.11e-87	88.8-100.0	4	3	2	2
Closteroviridae	<i>Closterovirus</i>	citrus tristeza virus	70.0-79.3	1.37e-34	37.4-100.0	3	4	7	6
Tombusviridae	<i>Gammacarmovirus</i>	melon necrotic spot virus	77.3	1.37e-34	71.9	0	1	0	0
Tymoviridae	<i>Tymovirus</i>	tomato blistering mosaic virus	70.5-79.9	0 ~ 8.81e-29	38.2-99.8	3	3	2	1
Virgaviridae	<i>Tobamovirus</i>	Virus C (Not reported in Brazil)	71.0-79.6	0 ~ 7.14e-59	48.7-99.6	0	2	3	1

1.6 References

BAČNIK, K.; KUTNJAK, D.; PECMAN, A.; MEHLE, N.; TUŠEK ŽNIDARIČ, M.; GUTIÉRREZ AGUIRRE, I.; RAVNIKAR, M. Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment. **Water Research**, v.177, p.115628, 2020. DOI: 10.1016/J.WATRES.2020.115628.

BONANNO FERRARO, G.; SUFFREDINI, E.; MANCINI, P.; VENERI, C.; IACONELLI, M.; BONADONNA, L.; MONTAGNA, M.T.; GIGLIO, O. DE; ROSA, G. LA. Pepper Mild Mottle Virus as Indicator of Pollution: Assessment of Prevalence and Concentration in Different Water Environments in Italy. **Food and Environmental Virology** 2021 13:1, v.13, p.117–125, 2021. DOI: 10.1007/S12560-020-09458-6.

BONANNO FERRARO, G.; VENERI, C.; MANCINI, P.; IACONELLI, M.; SUFFREDINI, E.; BONADONNA, L.; LUCENTINI, L.; BOWO-NGANDJI, A.; KENGNE-NDE, C.; MBAGA, D.S.; MAHAMAT, G.; TAZOKONG, H.R.; EBOGO-BELOBO, J.T.; NJOUOM, R.; KENMOE, S.; ROSA, G. LA. A State-of-the-Art Scoping Review on SARS-CoV-2 in Sewage Focusing on the Potential of Wastewater Surveillance for the Monitoring of the COVID-19 Pandemic. **Food and environmental virology**, v.14, 2022. DOI: 10.1007/S12560-021-09498-6.

BROWNELL, M.J.; HARWOOD, V.J.; KURZ, R.C.; MCQUAIG, S.M.; LUKASIK, J.; SCOTT, T.M. Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. **Water Research**, v.41, p.3747–3757, 2007. DOI: 10.1016/J.WATRES.2007.04.001.

BUSHNELL, B.; ROOD, J.; SINGER, E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. **PLOS ONE**, v.12, p.e0185056, 2017. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0185056.

CANTALUPO, P.G.; CALGUA, B.; ZHAO, G.; HUNDESA, A.; WIER, A.D.; KATZ, J.P.; GRABE, M.; HENDRIX, R.W.; GIRONES, R.; WANG, D.; PIPAS, J.M. Raw sewage harbors diverse viral populations. **mBio**, v.2, 2011. DOI: 10.1128/MBIO.00180-11/SUPPL_FILE/MBO005111170ST1.XLSX.

FAVARA, G.M.; CAMELO-GARCÍA, V.M.; NAGATA, T.; SILVA, J.M.F.; SAITO, M.; REZENDE, J.A.M.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Tobacco mild green mosaic virus found naturally infecting *Nicotiana glauca* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v.14, p.1–2, 2019. DOI: 10.1007/S13314-019-0345-6/FIGURES/1.

FERNANDEZ-CASSI, X.; TIMONEDA, N.; MARTÍNEZ-PUCHOL, S.; RUSIÑOL, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; FIGUEROLA, N.; BOFILL-MAS, S.; ABRIL, J.F.; GIRONES, R. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for

public health surveillance. **Science of the Total Environment**, v.618, p.870–880, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.249.

GYAWALI, P.; CROUCHER, D.; AHMED, W.; DEVANE, M.; HEWITT, J. Evaluation of pepper mild mottle virus as an indicator of human faecal pollution in shellfish and growing waters. **Water Research**, v.154, p.370–376, 2019. DOI: 10.1016/j.watres.2019.02.003.

KITAJIMA, M.; SASSI, H.P.; TORREY, J.R. **Pepper mild mottle virus as a water quality indicator** *npj Clean Water* Nature Research, , 2018. Disponível em: <www.nature.com/npjcleanwater>. Acesso em: 6 jan. 2021

MARTÍNEZ-PUCHOL, S.; RUSIÑOL, M.; FERNÁNDEZ-CASSI, X.; TIMONEDA, N.; ITARTE, M.; ANDRÉS, C.; ANTÓN, A.; ABRIL, J.F.; GIRONES, R.; BOFILL-MAS, S. Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. **Science of the Total Environment**, v.713, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136604.

MENZEL, P.; NG, K.L.; KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications** 2016 7:1, v.7, p.1–9, 2016. DOI: 10.1038/ncomms11257.

MOURA, M.C.F.; HOLANDA, I.S.A.; SALES JÚNIOR, R.; QUEIROZ, A.P.O.; ARAÚJO, E.O.A.; OLIVEIRA, G.D.C.; NUNES, G.H.S.; NAGATA, T.; NEGREIROS, A.M.P. First Report of Melon necrotic spot virus in Melon Plantations in Brazil. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1391-PDN>, v.102, p.1048, 2018. DOI: 10.1094/PDIS-09-17-1391-PDN.

NAGAI, A.; DUARTE, L.M.L.; CHAVES, A.L.R.; ALEXANDRE, M.A.V.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; HAKAKAVA, R.; SANTOS, D.Y.A.C. DOS. First Complete Genome Sequence of an Isolate of Tomato Mottle Mosaic Virus Infecting Plants of Solanum lycopersicum in South America. **Genome Announcements**, v.6, 2018. DOI: 10.1128/GENOMEA.00427-18.

NAKAMURA, K.; IWAI, M.; ZHANG, J.; OBARA, M.; HORIMOTO, E.; HASEGAWA, S.; KURATA, T.; TAKIZAWA, T. Detection of a Novel Recombinant Norovirus from Sewage Water in Toyama Prefecture, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis**, v.62, p.394–398, 2009.

NG, T.F.F.; MARINE, R.; WANG, C.; SIMMONDS, P.; KAPUSINSZKY, B.; BODHIDATTA, L.; ODERINDE, B.S.; WOMMACK, K.E.; DELWART, E. High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. **Journal of Virology**, v.86, p.12161–12175, 2012. DOI: 10.1128/JVI.00869-12/ASSET/7D80F05B-AD0A-40B9-86C8-C75641383D59/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9990967910001.JPEG.

ROSARIO, K.; SYMONDS, E.M.; SINIGALLIANO, C.; STEWART, J.; BREITBART,

M. Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.7261–7267, 2009. DOI: 10.1128/AEM.00410-09.

SILVA, L.A. DA; 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). **PeerJ**, v.2019, 2019. DOI: 10.7717/PEERJ.6285/SUPP-4.

SYMONDS, E.M.; NGUYEN, K.H.; HARWOOD, V.J.; BREITBART, M. Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. **Water Research**, v.144, p.1–12, 2018. DOI: 10.1016/J.WATRES.2018.06.066.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v.38, p.3022–3027, 2021. DOI: 10.1093/MOLBEV/MSAB120.

XAGORARAKI, I.; O'BRIEN, E. Wastewater-Based Epidemiology for Early Detection of Viral Outbreaks. p.75–97, 2020. DOI: 10.1007/978-3-030-17819-2_5.

ZHANG, T.; BREITBART, M.; LEE, W.H.; RUN, J.-Q.; WEI, C.L.; SOH, S.W.L.; HIBBERD, M.L.; LIU, E.T.; ROHWER, F.; RUAN, Y. RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. **PLOS Biology**, v.4, p.e3, 2005. DOI: 10.1371/JOURNAL.PBIO.0040003.

Parte II - Tema 2: Caracterização da *ORFN1* putativa do pepper ringspot virus

Família *Virgaviridae*

Os vírus da família *Virgaviridae* possuem vírions em forma de bastonete, que são formados por subunidades de proteínas da capa, e podem ter entre 20 e 25 nm de diâmetro. Os membros desta família têm um genoma de RNA de fita simples de senso positivo com uma estrutura semelhante a t-RNA na região da extremidade 3' do segmento do genoma, uma proteína da capa pesando 19-24 kDa e uma proteína de replicação de conformação α -helicoidal (Adams et al., 2009). A família é constituída por sete gêneros: *Furovirus*, *Goravirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* e *Tobravirus* que são diferenciados conforme o número de componentes do genoma, organização do genoma e modo de transmissão (Adams et al., 2017).

Dentre os vírus desta família, o número de segmentos genômicos pode variar conforme o gênero, podendo apresentar um, dois ou três segmentos. Os gêneros *Hordeivirus* e *Pomovirus* possuem vírus com genomas de tri-segmentados, os vírus dos gêneros *Furovirus*, *Goravirus*, *Pecluvirus* e *Tobravirus* tem genomas bissegmentados, e somente o gênero *Tobamovirus* apresenta vírus com genomas monosegmentados (Adams et al., 2009). Todos os membros da família *Virgaviridae* podem ser transmitidos mecanicamente, especialmente para os membros do gênero *Tobamovirus*, para o qual não há vetor natural conhecido. Os vírus do gênero

Hordeivirus são transmitidos através do pólen e sementes, enquanto os do gênero *Goravirus* são transmitidos por pólen. Os membros dos gêneros *Furovirus*, *Pecluvirus*, e *Pomovirus* são transmitidos por fungos de solo. E os vírus do gênero *Tobravirus* são transmitidos por nematoides parasitas de plantas (Adams et al., 2017). O gênero *Tobravirus* foi objeto do nosso estudo nos próximos capítulos.

Gênero *Tobravirus*

O gênero *Tobravirus* é composto por apenas três espécies relatadas no mundo, *Tobacco rattle virus*, *Pea early-browning virus* e *Pepper ringspot virus* (Adams et al., 2012). *Tobacco rattle virus* (TRV) é amplamente distribuída em diferentes regiões geográficas (Europa, América do Norte e Central, Nova Zelândia, Austrália, China e Japão), infectando um grande número de espécies vegetais, incluindo tabaco e batata. *Pea-early-browning virus* (PEBV) foi encontrado na Europa Ocidental, principalmente na Holanda e no Reino Unido, infectando hospedeiras leguminosas como ervilhas (*Pisum sativum*) e feijões (*Phaseolus* spp.). Até o presente momento, *Pepper ringspot virus* (PepRSV) foi descrito apenas no Brasil e pode causar doenças principalmente em pimenta e tomate (Kitajima et al., 1969; MacFarlane, 1999; Adams et al., 2012; Kitajima 2020).

Organização genômica dos *Tobravirus*

Os vírions de *Tobravirus* são alongados e rígidos, e seus genomas possuem dois segmentos genômicos de RNA (RNA-1 e RNA-2), ambos de fita simples, linear

de sentido positivo, e que são encapsidados individualmente. As moléculas de RNA-1 são semelhantes em tamanho, com cerca de 6,8 kb, e o RNA-2 varia de 1,8 kb a cerca de 4,5 kb de tamanho (variando em diferentes isolados) (MacFarlane, 1999; Adams et al., 2012). Entre os poucos isolados de tobrovírus sequenciados até o momento, as sequências do RNA-1 de TRV apresentaram 99% de identidade entre as ORFs conservadas (MacFarlane, 1999). A região não codificante da região 5' (5' UTR) do RNA-1 tem pouca semelhança com o RNA-2 do mesmo isolado, mas contém uma repetição direta e incompleta de 22 nucleotídeos que também está presente na região 5' UTR do RNA-2 (Hamilton et al., 1987). Entre os fragmentos genômicos RNA-1 e RNA-2, até 73% de identidade também foi observada na região 3' UTR (Robinson & Harrison, 1985).

O RNA-1 apresenta genes que são responsáveis por codificar proteínas não estruturais que são necessárias para a infecção viral. A ORF1 codifica proteínas de replicação viral, sendo que a subunidade menor, denominada ORF1a (134-141 kDa) contém domínios de metiltransferase e helicase, e a subunidade maior, denominada ORF1b (194-201 KDa) codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), por meio do mecanismo “ribossomal readthrough” (Hamilton et al., 1987; Koonin, 1991; Rozanov et al., 1992). A ORF2 codifica a proteína de movimento (MP) célula-a-célula (29-30 kDa) e a ORF3 codifica o supressor de silenciamento gênico, p16, que tem papel na interferência da formação do complexo RISC por meio de associação com a proteína AGO 4 (16 kDa) (Ghazala et al., 2008; Martín-Hernández & Baulcombe, 2008; Deng et al., 2013). As proteínas codificadas pela ORF1 (metiltransferase, helicase e RdRp) são traduzidas diretamente do RNA-1, enquanto

as proteínas codificadas pelas ORF2 e ORF3 (MP e p16) são traduzidas a partir de RNAs sub-genômicos (sgRNAs) (Robinson, 1983; Goulden et al., 1990).

O RNA-2 codifica uma proteína capsidial (CP) (22-24 kDa) e as proteínas não estruturais 2b e 2c (com variação entre 1,8-3,9 kDa), localizadas *downstream* da CP, que estão envolvidas na transmissão por nematoides de vírus do gênero *Tobravirus* (Hughes et al., 1986; MacFarlane et al., 1995). A deleção das proteínas 2b e 2c do RNA-2 pode afetar a transmissão por nematoide, sendo assim, os isolados contendo apenas a proteína CP não são capazes de serem transmitidos por nematoides. Acredita-se que a proteína 2b tem importância fundamental na distribuição do vírus entre o caule e raiz da plantas (Vassilakos et al., 2001).

Pepper ringspot virus

O PepRSV foi relatado pela primeira vez na década de 60, em Campinas (São Paulo), em plantas de *Capsicum* spp. (Kitajima & Costa, 1969) e, até o momento, sua ocorrência parece estar restrita ao Brasil. Inicialmente, o isolado foi considerado como uma estirpe de TRV, mas as análises de sua sequência genômica mostraram que se tratava de uma nova espécie do gênero (Bergh et al., 1985; Robinson & Harrison, 1985).

Atualmente, foram caracterizados e sequenciados três isolados de PepRSV: CAM, Pivo4 e LAV. O isolado CAM, que foi o primeiro a ser identificado em Campinas (SP) e o primeiro a ter genoma caracterizado de forma molecular, não apresenta os genes que codificam as proteínas 2b e 2c, e acredita-se que esses genes podem ter sido deletados durante a manutenção do isolado por meio de

inoculações mecânicas repetidas vezes (Bergh et al., 1985). Os isolados LAV e Pivo4, que foram coletados em 2012 na região de Luziânia – GO (Batista et al., 2014). Recentemente, um novo isolado de PepRSV foi identificado e denominado PepRSV Ag1, o qual foi encontrado em Alexandre Gusmão, Distrito Federal, no ano em 2016, infectando plantas de tomateiro estaqueado tipo “grape”. O sequenciamento do RNA-2 do isolado Ag1 demonstrou uma organização gênica relativamente distinta quando comparado aos outros isolados caracterizados (Tavares-Esashika, 2021).

Ambos os RNAs genômicos de PepRSV apresentam *cap* na extremidade 5' e uma estrutura do tipo RNA transportador (tRNA) na extremidade 3'. Os três isolados de PepRSV diferem entre si na organização genômica do RNA-2. O RNA 2 do isolado CAM apresenta 1799 nucleotídeos (nts), o isolado LAV 2044 nts, e o isolado Pivo4 1877 nts (Batista et al., 2014). O RNA-2 do isolado CAM não apresenta os genes que codificam as proteínas 2b e 2c e na extremidade 3' há uma deleção de 418 nts comparando com o isolado LAV. O isolado Pivo4 também não possui genes para as proteínas 2b e 2c, e na extremidade 3' tem uma deleção de 167 nt. O isolado LAV possui em sua região 3' uma provável ORF, porém, essa região não apresenta homologia com a proteína 2b de TRV e PEBV. Além disso, a extremidade 5' do isolado CAM apresenta repetições incompletas (AA'BB'), que são ausentes nos isolados LAV e Pivo4. Finalmente, a extremidade 3' de todos os isolados demonstra que houve recombinação com a extremidade 3' do RNA-1 (Figura 2) (Batista et al., 2014).

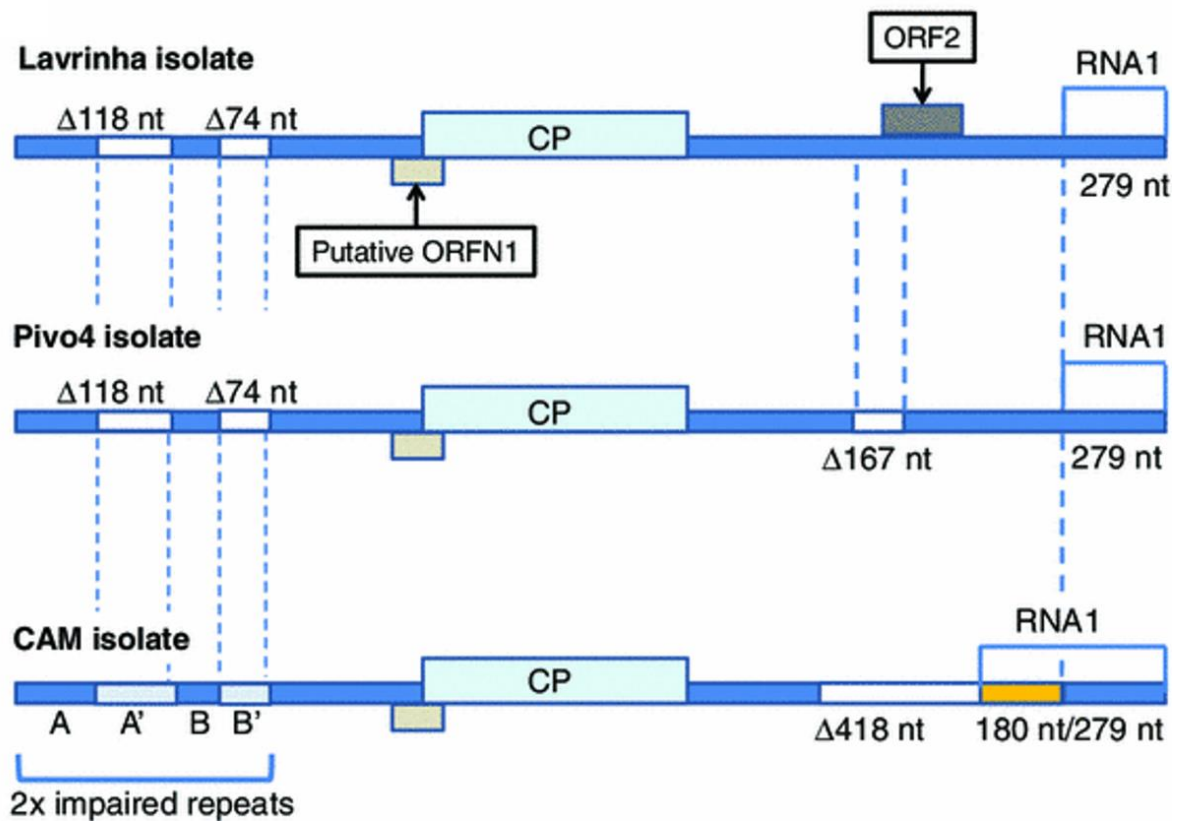


Figura 2: Organização genômica dos três isolados de PepRSV (Fonte: Batista et al., 2014). CP = capa proteica; Δ = deleções; nt = nucleotídeos.

Outra característica interessante no genoma do RNA-2 está relacionada à região 5' UTR, onde o gene que codifica a CP aparentemente não é traduzido diretamente por tradução dependente de *cap*. Acredita-se que um RNA subgenômico do gene CP é produzido antes da tradução. Sendo assim, sequências AUG podem ocorrer várias vezes na 5' UTR a montante do códon de iniciação funcional do gene CP (MacFarlane, 1999). O RNA-2 do isolado CAM apresenta 11 sequências AUG a montante do códon de início funcional. O isolado de LAV apresenta seis sequências e o isolado Pivo4, sete. Uma ORF adicional (*ORFN1* putativa) foi prevista a montante do gene CP. A proteína putativa foi analisada e apresentou um domínio

transmembranar semelhante a 6K2 do potyvírus do turnip mosaic virus (TuMV) e TGB3 do potexvírus plantago asiatica mosaic virus (PIAMV).

Foi demonstrado que estas proteínas (6K2 e TGB3) estão envolvidas na ativação de fatores de transcrição (bZIP17, bZIP28 e bZIP60) em *Arabidopsis thaliana*, envolvidos no mecanismo de ativação da *Unfolded Protein Response* (UPR), uma resposta ao estresse conservada em organismos eucarióticos e ativada para gerenciar o acúmulo de proteínas desdobradas e mal dobradas no RE, para prolongar a viabilidade celular ou sob estresse severo ou crônico, (Williams et al., 2014; Bao & Howell, 2017). Neste mecanismo, os sensores de estresse do RE reconhecem as proteínas desdobradas acumuladas e aumentam a síntese de chaperonas para redobrar ou decompor proteínas. Esta resposta serve para aliviar as condições no RE e recuperar a homeostase (Liu et al., 2012; Angelos et al., 2017). A interação destes fatores e destas proteínas viras estão associados a inibição da infecção viral, uma vez que o aumento no dobramento de proteínas durante a resposta UPR diminui o acúmulo de partículas virais (Gayral et al., 2020). A identificação e localização dessa provável *ORFN1* em PepRSV foi o objetivo do próximo capítulo.

Objetivos

Objetivo geral

Com a hipótese de que a *ORFN1* putativa é traduzida e interage com retículo endoplasmático (RE) para diminuir o estresse de RE (diminuir “Unfolded protein

response”), o objetivo desse capítulo é de caracterizar a *ORFN1* putativa de PepRSV utilizando o clone infeccioso de PepRSV RNA-2 Ag1.

Objetivos específicos

1. Confirmar a expressão do gene *ORFN1* por *Western blotting* e imunocitoquímica;

2. Avaliar as diferenças em respostas do hospedeiro de *Nicotiana benthamiana* quando infectadas por isolados de PepRSV Ag1 mutantes no gene *ORFN1*.

Referências

ADAMS, M.J.; ADKINS, S.; BRAGARD, C.; GILMER, D.; LI, D.; MACFARLANE, S.A.; WONG, S.M.; MELCHER, U.; RATTI, C.; RYU, K.H. ICTV virus taxonomy profile: Virgaviridae. **Journal of General Virology**, v.98, p.1999–2000, 2017. DOI: 10.1099/jgv.0.000884.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; KREUZE, J. Virgaviridae: A new family of rod-shaped plant viruses. **Archives of Virology**, v.154, p.1967–1972, 2009. DOI: 10.1007/s00705-009-0506-6.

ADAMS, M.J.; HEINZE, C.; JACKSON, A.O.; KREUZE, J.F.; MACFARLANE, S.A. AND; TORRANCE, L. Virgaviridae. In: **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. International Union of Microbiological Societies – Virology Division. London: Elsevier**, v.8, p.1462, 2012. DOI: 10.1016/b978-0-12-384684-6.00097-5.

ANGELOS, E.; RUBERTI, C.; KIM, S.J.; BRANDIZZI, F. Maintaining the factory: the roles of the unfolded protein response in cellular homeostasis in plants. **The Plant Journal**, v.90, p.671–682, 2017. DOI: 10.1111/TPJ.13449.

BAO, Y.; HOWELL, S.H. The unfolded protein response supports plant development and defense as well as responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.344, 2017. DOI: 10.3389/FPLS.2017.00344/BIBTEX.

BATISTA, A.R.S.; NICOLINI, C.; RODRIGUES, K.B.; MELO, F.L.; VASQUES, R.M.; MACÊDO, M.A. DE; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T. Unique RNA 2 sequences of two Brazilian isolates of Pepper ringspot virus, a tobnavirus. **Virus Genes**, v.49, p.169–173, 2014. DOI: 10.1007/s11262-014-1066-8.

BERGH, S.T.; KOZIEL, M.G.; HUANG, S.C.; THOMAS, R.A.; GILLEY, D.P.; SIEGEL, A. The nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-2 (CAM strain). **Nucleic Acids Research**, v.13, p.8507, 1985. DOI: 10.1093/NAR/13.23.8507.

DENG, X.; KELLONIEMI, J.; HAIKONEN, T.; VUORINEN, A.L.; ELOMAA, P.; TEERI, T.H.; VALKONEN, J.P.T. Modification of Tobacco rattle virus RNA1 to serve as a VIGS vector reveals that the 29K movement protein is an RNA silencing suppressor of the virus. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v.26, p.503–514, 2013. DOI: 10.1094/MPMI-12-12-0280-R.

GAYRAL, M.; ARIAS GAGUANCELA, O.; VASQUEZ, E.; HERATH, V.; FLORES, F.J.; DICKMAN, M.B.; VERCHOT, J. Multiple ER-to-nucleus stress signaling pathways are activated during *Plantago asiatica* mosaic virus and Turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.103, p.1233–1245, 2020. DOI: 10.1111/TPJ.14798.

GHAZALA, W.; WALTERMANN, A.; PILOT, R.; WINTER, S.; VARRELMANN, M. Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. **Journal of General Virology**, v.89, p.1748–1758, 2008. DOI: 10.1099/VIR.0.83503-0/CITE/REFWORKS.

GOULDEN, M.G.; LOMONOSSOFF, G.P.; DAVIES, J.W.; WOOD, K.R. The complete nucleotide sequence of PEBV RNA2 reveals the presence of a novel open reading frame and provides insights into the structure of tobnaviral subgenomic promoters. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.4507, 1990. DOI: 10.1093/NAR/18.15.4507.

HAMILTON, W.D.; BOCCARA, M.; ROBINSON, D.J.; BAULCOMBE, D.C. The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-1. **The Journal of general virology**, v.68 (Pt 10), p.2563–2575, 1987. DOI: 10.1099/0022-1317-68-10-2563.

HUGHES, G.; DAVIES, J.W.; WOOD, K.R. In vitro translation of the bipartite genomic RNA of pea early browning virus. **Journal of General Virology**, v.67, p.2125–2133, 1986. DOI: 10.1099/0022-1317-67-10-2125.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Association of Pepper Ringspot Virus (Brazilian Tobacco Rattle Virus) and Host Cell Mitochondria. **Journal of General Virology**, v.4, p.177–181, 1969. DOI: 10.1099/0022-1317-4-2-177.

KITAJIMA, E.W.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Morfologia das partículas do vírus do anel do pimentão. **Bragantia**, v.28, p.1–22, 1969. DOI: 10.1590/s0006-87051969000100001.

KITAJIMA, E.W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, v.20, e20190932, 2020. DOI: 10.1590/1676-0611-BN-2019-0932.

KOONIN, E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. **The Journal of general virology**, v.72 (Pt 9), p.2197–2206, 1991. DOI: 10.1099/0022-1317-72-9-2197.

LIU, Y.; BURGOS, J.S.; DENG, Y.; SRIVASTAVA, R.; HOWELL, S.H.; BASSHAM, D.C. Degradation of the Endoplasmic Reticulum by Autophagy during Endoplasmic Reticulum Stress in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.24, p.4635–4651, 2012. DOI: 10.1105/TPC.112.101535.

MACFARLANE, S.A. **Molecular biology of the tobnaviruses** *Journal of General Virology* Society for General Microbiology, 1999.

MACFARLANE, S.A.; BROWN, D.J.F.; BOL, J.F. The transmission by nematodes of tobnaviruses is not determined exclusively by the virus coat protein. **European Journal of Plant Pathology** 1995 101:5, v.101, p.535–539, 1995. DOI: 10.1007/BF01874478.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, A.M.; BAULCOMBE, D.C. Tobacco Rattle Virus 16-Kilodalton Protein Encodes a Suppressor of RNA Silencing That Allows Transient Viral Entry in Meristems. **Journal of Virology**, v.82, p.4064–4071, 2008. DOI: 10.1128/JVI.02438-07/ASSET/51479A7A-6D5E-41EB-B09A-4011C636E671/ASSETS/GRAPHIC/ZJV0080804710006.JPEG.

ROBINSON, D.J. RNA Species of Tobacco Rattle Virus Strains and Their Nucleotide Sequence Relationships. **Journal of General Virology**, v.64, p.657–665, 1983. DOI: 10.1099/0022-1317-64-3-657.

ROBINSON, D.J.; HARRISON, B.D. Evidence that Broad Bean Yellow Band Virus Is a New Serotype of Pea Early-browning Virus. **Journal of General Virology**, v.66, p.2003–2009, 1985. DOI: 10.1099/0022-1317-66-9-2003.

ROZANOV, M.N.; KOONIN, E. V.; GORBALENYA, A.E. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the “Sindbis-like” supergroup of positive-strand RNA viruses. **The Journal of general virology**, v.73 (Pt 8), p.2129–2134, 1992. DOI: 10.1099/0022-1317-73-8-2129.

TAVARES-ESASHIKA, M.L. TESE: **CONSTRUÇÃO DO CLONE INFECCIOSO E VETOR VIRAL DE PEPPER RINGSPOT VIRUS**. 2021. 114p. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA,

VASSILAKOS, N.; VELLIOS, E.K.; BROWN, E.C.; BROWN, D.J.F.; MACFARLANE, S.A. Tobravirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes. **Virology**, v.279, p.478–487, 2001. DOI: 10.1006/viro.2000.0677.

WILLIAMS, B.; VERCHOT, J.; DICKMAN, M.B. When supply does not meet demand-ER stress and plant programmed cell death. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p.211, 2014. DOI: 10.3389/FPLS.2014.00211/BIBTEX.

Capítulo 2:

Expressão *in vivo* do gene *ORFN1* de pepper ringspot virus (PepRSV-Ag1) e resposta diferencial de *Nicotiana benthamiana* à infecção por isolados mutantes

2.1 Introdução

Pepper ringspot virus (PepRSV) é um vírus restrito ao Brasil, relatado pela primeira vez no Brasil na década de 1960 (Kitajima & Costa, 1969), infectando plantas de *Capsicum sp.* Que apresentavam sintomas de mancha anelar em suas folhas. Até o momento quatro isolados (CAM, Pivo4, LAV e Ag1) de PepRSV foram caracterizados e sequenciados, sendo o CAM, proveniente de Campinas, estado de São Paulo, o primeiro isolado brasileiro caracterizado a nível molecular (Batista et al., 2014; Tavares-Esashika, 2021).

O PepRSV pertence ao gênero *Tobravirus*, que consiste em três espécies: Pepper ringspot virus (PepRSV), Tobacco rattle virus (TRV) e Pea early browning virus (PEBV) (Adams et al., 2012). Durante algum tempo o PepRSV foi considerado uma cepa do TRV, porém, análises de suas sequências genômicas revelaram que se tratava de vírus distintos. A identidade da sequência de aminoácidos da proteína

da capa proteica (CP) do PepRSV é inferior a 70%, e o RNA 2 tem uma região não traduzida (UTR) diferente das demais espécies (Bergh et al., 1985).

Os tobravírus apresentam genoma de RNA bipartido fita simples, de sentido positivo. O RNA1 codifica proteínas necessárias para a infecção viral. A região 5' próxima a ORF ("open reading frame") codifica uma proteína de massa molecular de 134-141 kDa, denominada de metiltransferase e helicase. A tradução do códon 3' terminal da ORF em uma estratégia conhecida como "leaky stop codon" dá origem a uma proteína de massa molecular de 194-201 kDa, constituindo a polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) (Koonin, 1991; Rozanov et al., 1992). A ORF1a codifica a proteína de movimento célula-a-célula de 29-30 kDa e a ORF1b codifica a proteína supressora de silenciamento gênico de 12-16 kDa (Hamilton & Baulcombe, 1989; Koonin et al., 1991). As proteínas helicase e RdRp são traduzidas diretamente do RNA1 e as proteínas 1a e 1b são traduzidas a partir de RNAs sub-genômicos. O RNA2 codifica a proteína de revestimento (CP) de 22-24 kDa e as proteínas não estruturais 2b e 2c de 1.8-3.9 kDa, que estão envolvidas na transmissão dos tobravírus por nematoides (Hughes et al., 1986; Goulden et al., 1992; Hernández et al., 1997).

Apesar de o PepRSV ter sido identificado há mais de cinco décadas, por ser um vírus restrito ao Brasil, ele não é tão amplamente estudado, provavelmente por ser um vírus restrito ao Brasil. Neste trabalho, um gene putativo denominado *ORFN1* foi identificado no isolado Ag1 de PepRSV, o qual está localizado no RNA-2 e apresenta uma região de sobreposição com a ORF CP. Ensaios de agroinoculação de clones infecciosos do PepRSV-Ag1 sugerem que a proteína codificada por *ORFN1* pode estar relacionada com os sintomas observados em *Nicotiana benthamiana*. A

proteína *ORFN1* foi ainda localizada em associação com o retículo endoplasmático (RE), provavelmente envolvida com a indução de estresse no RE, e ativação de resposta de proteína desdobrada (UPR) e morte celular programada em *N. benthamiana*.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Vírus

Este estudo foi realizado tendo como fonte o clone infeccioso do PepRSV RNA-2 Ag1 desenvolvido a partir do isolado Ag1 do PepRSV, identificado em 2016 na região de Alexandre Gusmão – DF. A sequência genômica do isolado foi inserido no vetor binário pJL89 e expresso em plantas de *N. benthamiana* (Tavares-Esashika, 2021).

2.2.2 Produção de anticorpo por peptídeo sintético

Para produção de anticorpos para *ORFN1* foi utilizada a estratégia de produzir o um peptídeo sintético a partir da sequência dessa ORF, a região antigênica foi localizada com auxílio da ferramenta The Immune Epitope Database (IEDB) (Vita et al., 2019).

Para que o peptídeo sintético tivesse eficácia na produção de anticorpos foi preciso conjugá-lo a uma proteína carreadora antes da imunização, para isso o peptídeo foi conjugado com a proteína carreadora KLH (keyhole limpet haemocyanin) de acordo com o protocolo de solução de conjugação de peptídeo-portador com ácido iodoacético (Trier et al., 2012)

A imunização foi feita em coelhos da raça Nova Zelândia Branca. Foi utilizado cerca de 0,33 mg de antígeno por injeção subcutânea com intervalo de 21 dias, totalizando três injeções. Na injeção, os antígenos foram emulsificados com adjuvante Freund's. Uma semana após a última injeção, foi realizada a primeira coleta de sangue (20 mL), e o sangue coletado foi mantido a 37 °C por 1 h e refrigerado a 4 °C noite toda. O sangue coagulado foi submetido à centrifugação de 4000 × g por 20 minutos para coleta do sobrenadante contendo o antissoro bruto. O sobrenadante foi aliquotado e armazenado a -20 °C.

Para a purificação do antissoro bruto foi realizada a adsorção cruzada com adição de extrato de *N. benthamiana* sadia ao soro bruto na proporção de 1:1 e incubados a 4 °C. A mistura foi centrifugada a 10000 × g por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e diluído com 9,5 mL de água ultrapura. Para precipitação de proteína foi adicionado 9,5 mL de solução saturada de sulfato de amônio (NH₄SO₄) gota-a-gota e incubado a 4 °C por 4 horas. Após esse período a solução foi centrifugada a 4500 rpm por 30 minutos e o pellet formado foi ressuspensa com 1 mL de ½ PBS pH 6,5 (PBS 10 × = 1,4 M NaCl + 2 mM KH₂PO₄ + 8 mM NaHPO₄.12H₂O + 2 mM KCl, pH 6,5). O soro bruto foi submetido a três diálises em tubos de celulose (Dialysis Tubing, Sigma-Aldrich) em agitação com ½ PBS pH 7,4 com intervalo de 2 horas para cada diálise. A imunoglobulina dialisada foi purificada com resina (DEAE Sephacel™ Amersham Biosciences, GE Healthcare Life Sciences), previamente foi equilibrada em coluna com a mesma solução de diálise. O volume total de imunoglobulina dialisada foi adicionado a coluna, eluída com 6 mL de ½ PBS pH 7,4 e coletado. Realizou-se a leitura de absorbância a 595

nm, o IgG-purificado foi diluído para a concentração de 1 mg/mL e armazenado a -20 °C.

Para teste dos anticorpos, foi realizado ensaio de Dot-ELISA, conforme citado anteriormente, com anticorpo purificado diluído na proporção de 1: 250. Além disso, também foi realizado ensaio de imunomarcação para visualização em microscopia de fluorescência. Para isso foram feitos cortes no tecido foliar de *N. benthamiana* agroinfiltrada com PepRSV e as células foram fixadas com glutaraldeído em microtubo (utilizar câmara de vácuo, 50 cmHg por 2 x) e incubadas noite toda a 4 °C. Depois as folhas foram lavadas três vezes, durante três minutos cada uma das vezes, com tampão PBS 1 x. Depois de lavadas as amostras foram colocadas em agarose (Low melting point) a 6-7% e incubadas a 4 °C por 30 minutos. As amostras foram então cortadas utilizando o equipamento micrótomo de lâmina vibratória Leica VT 1000 S, nas espessuras de 20 e 40 micrometros. As amostras foram colocadas em lâminas e foram levadas para bloquear com 1 x PBS / BSA 5% / 1% Troton X100 (0,5 g de BSA em 10 mL de 1 x PBS e 100 uL de Triton X100), sob agitação por 30 minutos, após esse período foi adicionado o anticorpo purificado para *ORFN1* na concentração de 1:250 diluído em PBS 1 x e BSA 5% e foi incubado sob agitação por uma hora. As amostras foram novamente lavadas por três vezes com PBS-T, incubadas por 3 minutos cada lavagem sob agitação, depois foi adicionado o anticorpo secundário IgG conjugado com Alexa fluor 488, uma gota para 500 µl de PBS 1 x, sob agitação por 30 minutos em câmara escura. As amostras foram novamente lavadas por mais três vezes com PBS-T e incubadas por 3 minutos em cada lavagem sob agitação em câmara escura, após as lavagens, foi aplicado

solução “anti-fade” para promover aderência da amostra a lâmina para visualização no microscópio

2.2.3 Construção dos plasmídeos mutantes

Na tentativa de caracterizar o gene putativo *ORFN1*, diferentes construções mutantes do clone original PepRSV RNA-2 Ag1, foram desenhadas com o intuito de avaliar a expressão da *ORFN1* em *N. benthamiana* (Figura 2.1). Para o desenvolvimento das construções mutantes do clone PepRSV RNA-2 Ag1, foi utilizada a técnica de clonagem Gibson Assembly (GA) (Gibson et al., 2009; Blawid & Nagata, 2015). Primes contendo extremidades sobrepostas, de modo que pudesse ocorrer recombinação e ligação dos fragmentos genômicos amplificados, foram desenhados de forma que mutações pudessem ser adicionadas ao clone/isolado original (Tabela 2.1). Além disso, proteínas de fluorescência foram fusionadas ao gene putativo *ORFN1* em algumas construções (Tabela 2.1). Para todas as construções foi mantido o sistema binário pJL89 como vetor de expressão.

Também foram utilizadas células de *Escherichia coli*, linhagens BL21-DE3 e BL21-AI, clonadas no vetor pET28a, para expressão da *ORFN1* para posterior produção de antissoro.

Tabela 2.1: sequência de primers para mutantes da *ORFN1*.

Nome do Primer	Sequência (5' -> 3')
Expressão em <i>N. benthamiana</i>	
Ag1-ORFN1_His_For	CATCATCACCACCATCATTGAGAGCGATTAAGTTCGCG
Ag1-ORFN1_His_Rev	ATGATGGTGGTGATGATGACCTAGTAGTAACATCTTTCCAATTCT
ORFN1-HIS_TerN For	CATCACCACCATCATAATTATACTGATTGTGCGATTTT
ORFN1-HIS-TerN Rev	TATGATGGTGGTGATGATGCATCCATTACACAAAAG
ORFN1_mCherry_For	AAAGATGTTACTACTAGGTATGGTGAGCAAGGGCGAG
ORFN1_mCherry_Rev	TGCAGCAACCAGTGGTCACTTGTACAGCTCGTCC

ORFN1_mGFP_For	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCA
ORFN1_mGFP_Rev	TTTGTATAGTTCATCCATGCC
Ag1_DeltaCP_For	GAAAGATGTTACTACTAGGTTGATTTGAATCGATTTAAGAGTTGTC
Ag1_DeltaCP_Rev	GACAACTCTTAAATCGATTCAAATCAACCTAGTAGTAACATCTTTC
ORFN1_Ag1_KO_For	TGTGTAATGGATACATAATTATAC
ORFN1_Ag1_KO_Rev	GTATAATTATGTATCCATTACACA
Backbone_2_For	TGACCACTGGTTGCTGC
Backbone_1_Rev	ACCTAGTAGTAACATCTTTCCAAT
pJL89_HALF_GA_LowTm_For	CCAATCAGGCTTGATCCCC
pJL89_HALF_GA_LowTm_Rev	TGGGGATCAAGCCTGATTG
<u>Expressão em <i>E. coli</i>:</u>	
pET28a-BB-For	GATCCGGCTGCTAACAAA
pET28a_BB_Rev	CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTA
ORFN1_U1_For1	TAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCACCACCATC ATAGATTTTGCCTTGCTGATC
ORFN1_U1_Rev1	GATCAGCAAGGCAAAATCTACCTAGTAGTAACATCTTTCCAA
ORFN1_U2_For2	TTGGAAAGATGTTACTACTAGGTAGATTTTGCCTTGCTGATC
ORFN1_U2_Rev2	TTTGTTAGCAGCCGGATCTCAACCTAGTAGTAACATCTTTC

As construções mutantes foram desenhadas de modo que: (1) o clone infeccioso original foi mantido inalterado para que fosse utilizado como controle; (2) toda a sequência do RNA 2 foi mantida, sendo adicionado ao N-terminal da *ORFN1* uma sequência de seis resíduos de histidina (His-Tag) para provar a expressão de *ORFN1*; (3) toda a sequência do RNA 2 foi mantida, porém a sequência His-Tag foi adicionada à região C-terminal da *ORFN1*; (4) e (5) foi adicionado à região C-terminal da *ORFN1* a sequência codificadora da proteína de fluorescência mCherry ou mGFP, como proteína marcadora para provar a expressão do *ORFN1* nos ensaios de microscopia confocal; (6) foi substituído um nucleotídeo do códon de iniciação da *ORFN1*, onde o ATG foi trocado por ATA, no intuito de nocautear esse gene; e (7) foi deletada toda a sequência codificadora da proteína CP, exceto a região de sobreposição com a *ORFN1*. Todos os esquemas das construções são mostrados na Figura 2.1.

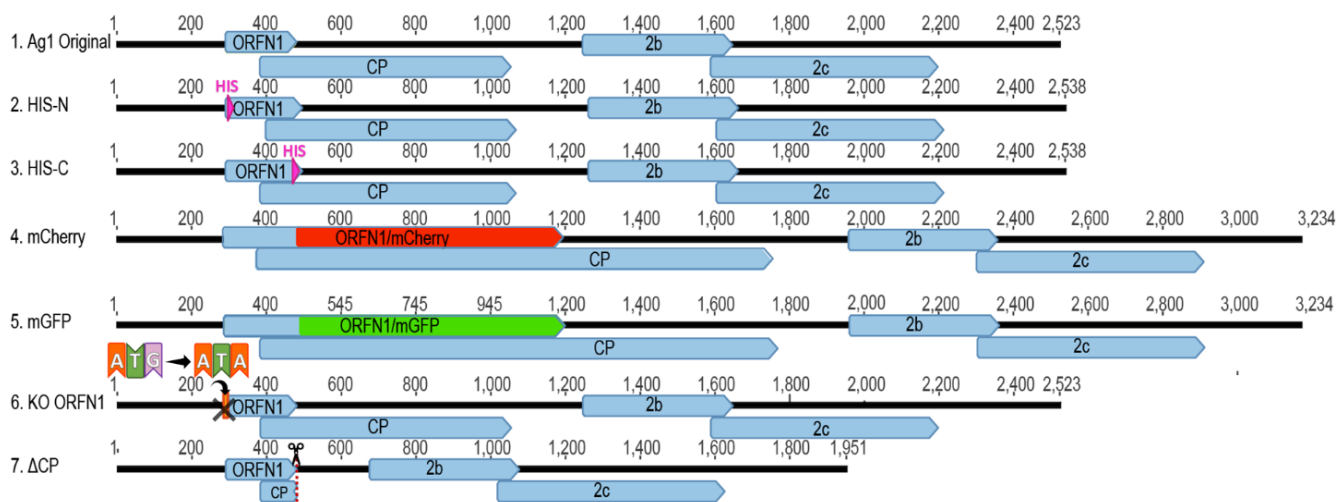


Figura 2.1: Esquema representando as construções desenhadas para expressão em *N. benthamiana*. HIS-N = inserção de histidina no N-terminal, HIS-C = inserção de histidina no C-terminal, KO = nocaute da ORF, Δ = deleções, CP = capa proteica.

As construções foram utilizadas para transformação, via eletroporação, de *Escherichia coli* cepa DH10B (Blawid & Nagata, 2015). Para confirmar as sequências dos clones, foi realizada PCR das colônias de cada clone com os primers pJL_35S For (AATTCCTGCAGGTCAACAT) e pJL_RZ_Rev (CTTAGCCATCCGAGTGGA). Os produtos de amplificação foram individualmente purificados usando o kit *Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, EUA) e diretamente sequenciados pelo método Sanger. O resultado do sequenciamento foi comparado com a sequência do clone infeccioso do PepRSV RNA-2 Ag1 original para confirmação das diferentes construções.

2.2.4 Expressão da *ORFN1* em *E. coli* e análise por SDS-PAGE e *Western blotting*

blotting

Foi utilizada uma colônia para cada plasmídeo recombinante (BL21-DE3: pET28a + *ORFN1* duplicada e BL21-AI: pET28a + *ORFN1* duplicada) o pré-inóculo foi realizado em 10 mL de meio LB líquido contendo Canamicina na concentração final de 50 µg/mL, foram feitos dois tubos para cada clone e 1 frasco cônico contendo o plasmídeo vazio para controle negativo, os frascos cônicos foram incubados a 28 °C sob agitação (180 rpm) “overnight”. Um inóculo (10 mL) foi preparado com 5% do pré-inóculo (500 µL) e submetido a crescimento, a 28 °C sob agitação (180 rpm), até atingir OD de 0,4 a 600 nm. Uma alíquota de cada inóculo foi retirada (tempo zero de indução) e outra para estoque em glicerol 80%. No restante das culturas foi adicionado IPTG (isopropil tiogalactosídeo) numa concentração final de 1 mM para a indução da expressão gênica em células BL21-DE3 e arabinose numa concentração de 2% final para células BL21-AI. Foram retiradas alíquotas da cultura a cada 4 horas e as amostras coletadas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos e o “pellet” estocado a -20 °C.

Os “pellets” foram ressuspensos em 2,5 mL de tampão de lise (50 mM KH₂PO₄ pH 7.8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10% de glicerol; 0,5% de Triton X-100; 10 mM Imidazol), agitando vigorosamente. A mistura foi incubada durante 10 minutos a 20 °C por três vezes, congelando e descongelando para auxiliar na quebra da parede celular. A amostra foi transferida ao gelo e após este procedimento foram adicionados 4 µl de Triton X-100 10% (v/v), em seguida, foram centrifugadas a 12.000 × g durante 10 minutos.

Foi adicionado a cada 10 µl de amostra 10µL de tampão 5 × SDS tampão de amostra com DTT (dithiothreitol) (250 mM Tris HCl pH 6,8; 10% SDS; 50% glicerol; 500 mM DTT) e as amostras foram fervidas durante 5 minutos e imediatamente incubadas em gelo. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 20%, a corrida eletroforética foi realizada durante 1 hora e meia a uma voltagem de 150 V. Explique que foram feitos dois géis um para corar com comassie e outro para o western. Marcador utilizado no gel SDS-PAGE.

Após a eletroforese um gel foi corado com a solução de Azul Brilhante de Comassie (Comassie 0,25%, metanol 50%, ácido acético 7%) e descorado com solução descorante (ácido acético 10%, etanol 30%) e outro gel foi colocado no equipamento Transblot SD Semi-Dry Eletrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) sob 1,3 A, 25 V por 20 minutos para a transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose. Após a transferência a membrana foi tratada com solução de e leite em pó desnatado 2% em PBS por 30 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada emPara detecção da proteína *ORFN1* foi utilizado como anticorpo primário anticorpo monoclonal de camundongo anti-His-Tag diluído na proporção de 1:3000, concentração final de 0,33 µg/mL, em tampão de bloqueio (2% de leite em pó desnatado) e a membrana foi colocada sob agitação por uma hora.

Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por três minutos em PBS 1 × Tween-20 0,1% e incubada por uma hora com anticorpo secundário anti-mouse IgG fosfatase alcalina conjugado na proporção de 1: 3000 (0,33 µg/mL) em tampão PBS 1 ×. Após lavagem com PBS 1 × contendo Tween-20 0,1% (PBS-T), a membrana foi incubada com 66 µL de NBT 10 mg/mL (Nitro-BlueTetrazolium em

dimetilformamida 70%) e 33 µL de BCIP 10 mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato em dimetilformamida 100%) por 5 minutos sob agitação.

2.2.5 Agroinfiltração dos mutantes da *ORFN1* em *N. benthamiana*

Para avaliar a expressão dos clones infecciosos mutantes do PepRSV RNA-2 Ag1 em plantas de *N. benthamiana*, as construções foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101), foi feito um pré-inóculo em 10mL de meio LB3 (10 g triptona; 5 g extrato de levedura; 4 g NaCl; 1 g KCl ; 3 g MgSO₄: 7H₂O para 1 litro de água e autoclavado) com os antibióticos gentamicina (50 µg/mL), rifampicina (20 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL), os tubos foram incubados a 28° C sob 180 rpm agitando durante a noite.

No dia seguinte, a cultura foi submetida a indução. Para isso, 2 ml de cultura com os construtos (RNA-1 original e RNA-2 original e mutantes) foram aliqüotados em 6 ml de tampão de indução completo (Bucher et al., 2003) e as soluções foram incubadas a 28 °C por um dia sob agitação a 180 rpm. No dia seguinte, o OD 600 das células foi medido para ajustar a concentração final para 2,0. As culturas foram centrifugadas a 5000 × g por 5 minutos e os pellets foram ajustados para a concentração final sendo ressuspensos com 1 mL de solução de meio Murashige-Skoog (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) contendo 1 M MES (pH 5,6) e 50 µM de acetosiringona. Para agroinfiltração, 1 mL de cada RNA-2 mutante foi misturado com 1 mL de PepRSV RNA-1, e um total de 2 mL da solução foi infiltrado em plantas de *N. benthamiana*.

A solução com agrobactérias transformantes foi infiltrada na parte abaxial de folhas jovens de *N. benthamiana* com cerca de seis semanas de idade, com

seringas sem agulha. Testes de infiltração a vácuo também foram realizados com os mutantes marcados com a proteína mGFP ou mCherry de modo que todas as células pudessem ser infectadas e visualizadas na microscopia confocal. mCherry contendo o peptídeo sinal e peptídeo de retenção de retículo endoplasmático (RE) também foi infiltrado para marcar o RE.

2.2.6 Western blotting dos mutantes da *ORFN1* expressos em *N. benthamiana*

Tecidos de folhas de plantas agroinfiltradas foram homogeneizados em 1 × PBS. As proteínas totais foram incubadas em 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 0,2% (v/v) Triton X-100, (pH 7.1) suplementado com PMSF (1 mM), e β-mercaptoetanol (2 mM) em água fervente por 5 min e centrifugado a 4°C e 11.000 × g por 15 min para remover os detritos celulares. As proteínas totais foram separadas por SDS-PAGE, e as proteínas alvo foram marcadas por *Western blotting* usando um anticorpo policlonal anti-GFP (anticorpo N-terminal; Sigma-Aldrich) ou um anticorpo policlonal anti-CP. Anticorpo de cabra anti-coelho (Sigma-Aldrich) conjugado com fosfatase alcalina foi usado como anticorpo secundário. Os tamanhos das proteínas foram estimados usando o padrão de massa molecular de proteína “Page Ruler protein ladder” (Thermo Fisher Scientific).

2.2.7 Microscopia confocal

Todas as análises de imagens de tecidos vegetais foram obtidas usando um microscópio confocal invertido Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems) com uma objetiva de imersão em óleo 63 ×, com os seguintes comprimentos de onda de excitação: mGFP foi excitado em 488 nm e a luz emitida foi capturada em 505 a 525 nm; a autofluorescência da clorofila foi emitida em 630 a 680 nm; mCherry foi

excitada usando 543 nm e capturada em 590 a 630 nm. A varredura de lapso de tempo foi realizada com o software do sistema de imagem Leica TCS-SP5. As imagens foram capturadas digitalmente e manipuladas usando o software do sistema de imagem Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems).

2.3 Resultados

2.3.1 Expressão da *ORFN1* em *E. coli* e análise por SDS-PAGE e *Western blotting*

O SDS-PAGE corado com azul de Comassie não possibilitou identificar a proteína recombinante expressada em *E. coli* em nenhum dos tempos de crescimento da cultura (tempo zero e quatro horas depois da indução). Também não foi possível identificar a proteína por meio de *Western blotting* em nenhum dos tempos de crescimento da cultura.

2.3.2 Produção de anticorpo por peptídeo sintético

Para teste do anticorpo IgG para anti-*ORFN1* produzido com peptídeo sintético, plantas infectadas com o clone infeccioso PepRSV Ag1 original foram imunomarcadas e observadas em microscópio de fluorescência. Como controle para a metodologia de imunomarcção, as mesmas plantas foram imunomarcadas com o anticorpo IgG anti-CP de PepRSV (TAVARES, 2017). Foi possível observar que a imunomarcção com o anticorpo IgG anti-CP ocorreu como o esperado, porém, a imunomarcção com o anticorpo IgG para anti-*ORFN1* produzido com peptídeo sintético reagiu no controle negativo (Figura 2.2), mostrando que não houve

especificidade na produção deste, e indicando que ele pode estar associado a moléculas da própria planta.

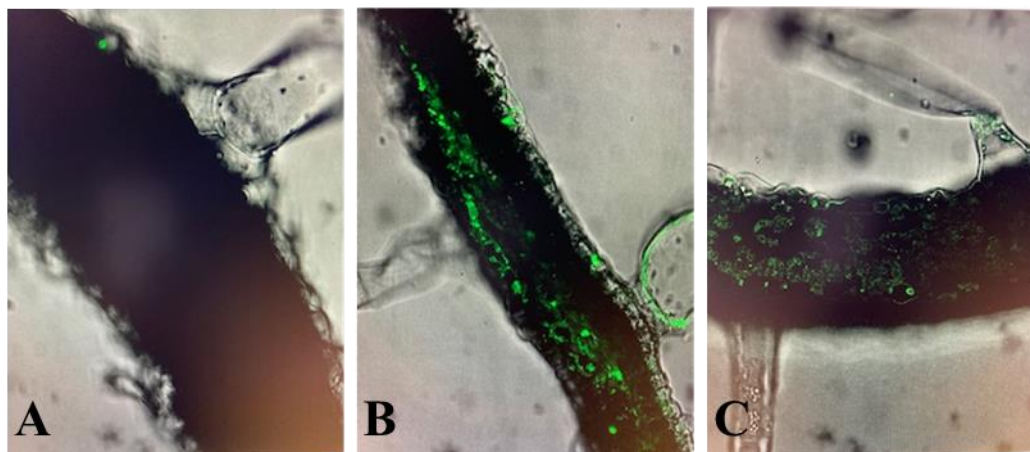


Figura 2.2: Imagens de microscopia de fluorescência de amostras de *N. benthamiana*. A: controle negativo, planta sadia marcada com anti-CP; B: planta infectada com o Clone PepRSV Ag1 Original marcada com anti-CP; C: controle negativo *ORFN1*, planta sadia marcada com anti-*ORFN1*.

2.3.3 *ORFN1* foi expresso em plantas infectadas

Como não foi possível produzir anticorpos específicos para *ORFN1*, a expressão de desse gene foi confirmada com a produção de proteína fusionada de *ORFN1*-GFP. O teste inicial de observação da expressão da GFP por meio de luz UV não foi possível, pois as plantas inoculadas não apresentaram sinal de fluorescência como era esperado. Então a expressão da proteína foi confirmada por meio da técnica de *Western blotting* com antissoro anti-GFP a partir de folhas agroinfiltradas a vácuo 4 dias após infiltração (dpi). Uma banda de proteína reagente com anti-GFP foi observada na posição de aproximadamente 34 kDa (massa molecular da proteína fusionada de *ORFN1*-GFP é ~33,8 kDa), demonstrando assim a expressão *in vivo* da *ORFN1* (Figura 2.3 - 1). Tentativas de detectar *ORFN1*

fusionada com HisTag não foram bem-sucedidas devido a indução de morte celular programada nas folhas onde foram infiltradas essas construções.

Para os ensaios de agroinfiltração a vácuo, também foram realizados testes com plantas agroinfiltradas, separadamente, apenas com a *ORFN1* fusionada a mGFP (Figura 2.3 - 1), *ORFN1*/mGFP e RE marcado com mCherry (Figura 2.3 - 2), *ORFN1* fusionada a mCherry (Figura 2.3 - 3), e apenas RE marcado com mCherry (Figura 2.3 - 4). Foi possível observar que os tratamentos com clones infecciosos com RE marcado com mCherry também apresentaram bandas de proteína reagente com anti-GFP logo acima da banda referente a *ORFN1*/mGFP, já o clone infeccioso da *ORFN1* fusionada com mCherry não reagiu ao anticorpo.

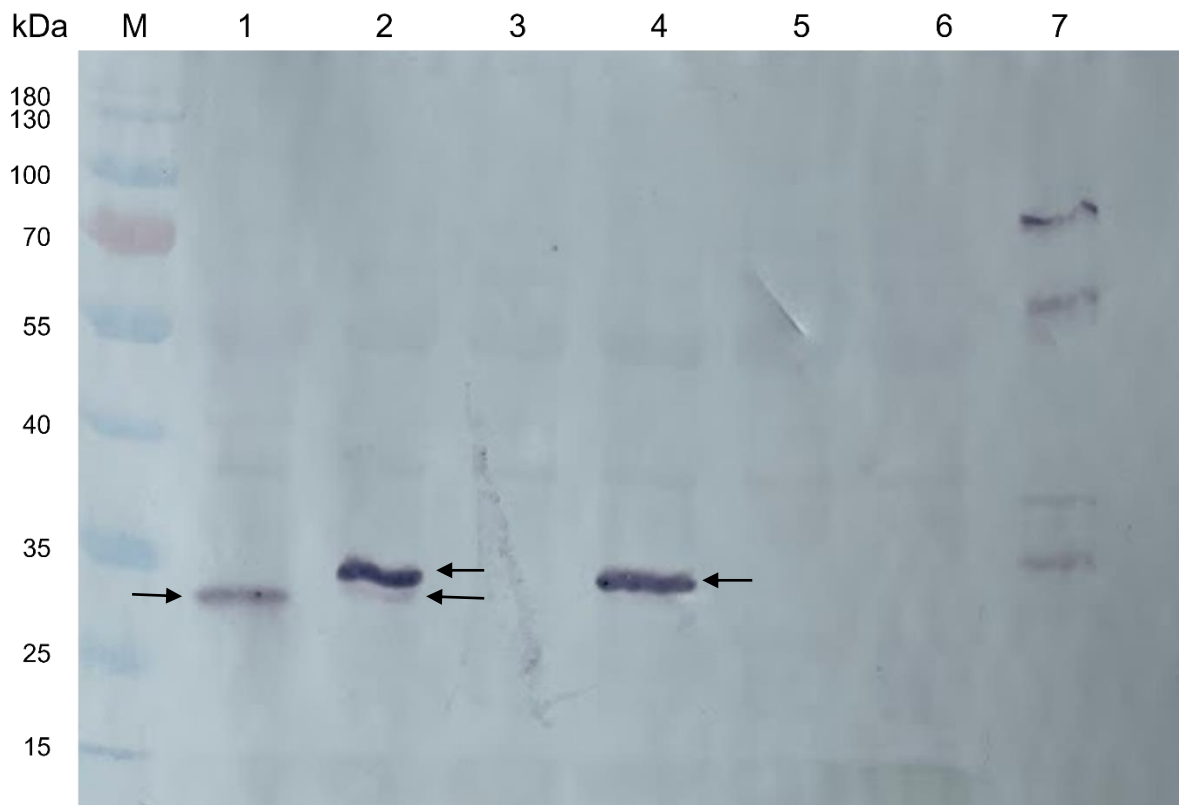


Figura 2.3 Western blotting (com anti-GFP) das folhas agroinfiltradas a vácuo com 4 dpi. (1) com o mutante *ORFN1*/mGFP; (2) *ORFN1*/mGFP e RE/mCherry; (3) *ORFN1*/mCherry; (4) RE/mCherry; (5) C- vetor vazio; (6) C- planta sadia; (7) C+ da proteína mGFP.

2.3.4 *ORFN1* é indispensável para a produção da capa proteica

Todos os mutantes foram capazes de infectar e causar sintomas nas plantas. Cinco dias após a agroinfiltração (dpi), as plantas inoculadas com o clone infeccioso de PepRSV Ag1 original (Figura 2.4 A), apresentaram os sintomas de encarquilhamento e bolhosidade, típicos da infecção sistêmica. As plantas inoculadas com os mutantes marcados com His-Tag no N-terminal da *ORFN1* (Figura 2.1 Construção 2; Figura 2.4 B e E) apresentaram sintomas de infecção sistêmica, sendo que o mutante marcado com His-Tag no N-terminal da *ORFN1* induziu sintomas mais intensos e severos de encarquilhamento e bolhosidade, indicando que essa alteração na proteína pode ter contribuído de alguma forma na manifestação de sintomas da infecção viral fazendo com que os sintomas ficassem mais intensos e severos. Já as plantas inoculadas com os mutantes marcados com His-Tag no C-terminal da *ORFN1* (Figura 2.1 Construção 3; Figura 2.4 C) apresentaram sintomas de lesão local necrótica nos locais onde a agroinfiltração por seringa foram realizadas, característica inesperada. Os mutantes desenhado para *knockout* da *ORFN1* (Figura 2.1 Construção 4) induziram sintomas interessantes de infecção, foi possível observar os sintomas típicos de infecção sistêmica como já era esperado, porém, a planta apresentou também sintomas de murcha e tombamento (Figura 2.4 D). Os mutantes com a proteína *ORFN1* fusionadas às proteínas de fluorescência mGFP e mCherry (Figura 2.4 F) induziram os sintomas típicos de encarquilhamento e bolhosidade, e o mutante *ORFN1*/GFP induziu sintomas ainda mais intensos de encarquilhamento e bolhosidade, quando foi realizada a agroinfiltração a vácuo (Figura 2.4 G).

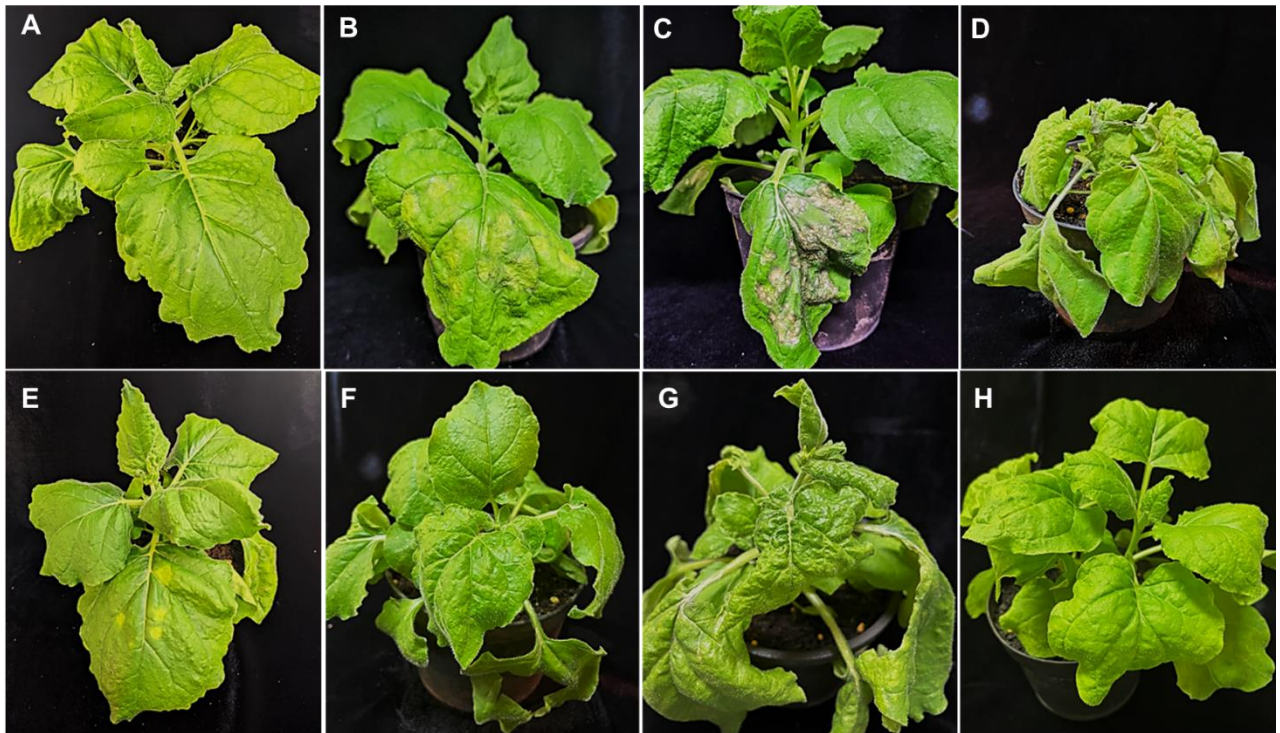


Figura 2.4: Plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas (5 dpi) com mutantes do clone infeccioso PepRSV Ag1. (A) Sintomas de encarquilhamento e bolhosidade nas plantas inoculadas com o clone Ag1 Original; (B) Sintomas de encarquilhamento e bolhosidade nas plantas inoculadas com o mutante marcado com His-Tag no N-terminal da *ORFN1*; (C) Sintomas de lesão local necrótica nas plantas inoculadas com o mutante marcado com His-Tag no C-terminal da *ORFN1*; (D) Sintomas de encarquilhamento, bolhosidade, murcha e tombamento nas plantas inoculadas com o mutante knockout da *ORFN1*; (E) Sintomas de encarquilhamento e bolhosidade nas plantas inoculadas com o mutante de deleção da CP. (F) Sintomas de encarquilhamento e bolhosidade nas plantas inoculadas com o mutante *ORFN1/mCherry*; (G) Sintomas intensos de encarquilhamento e bolhosidade nas folhas que foram agroinfiltradas a vácuo; (H) controle negativo com o vetor pJL89 vazio.

As folhas agroinfiltradas submetidas a ensaios de *Western blotting* com antissoro anti-CP, demonstram que a expressão da capa proteica foi realizada apenas nas plantas inoculadas com o clone infeccioso PepRSV Ag1 original (Figura 2.5 - 1), enquanto as demais mutações não apresentaram resultados que indicassem a expressão de CP. As bandas fracas que aparecem na posição de ~55 kDa são consideradas de RuBisCo L.

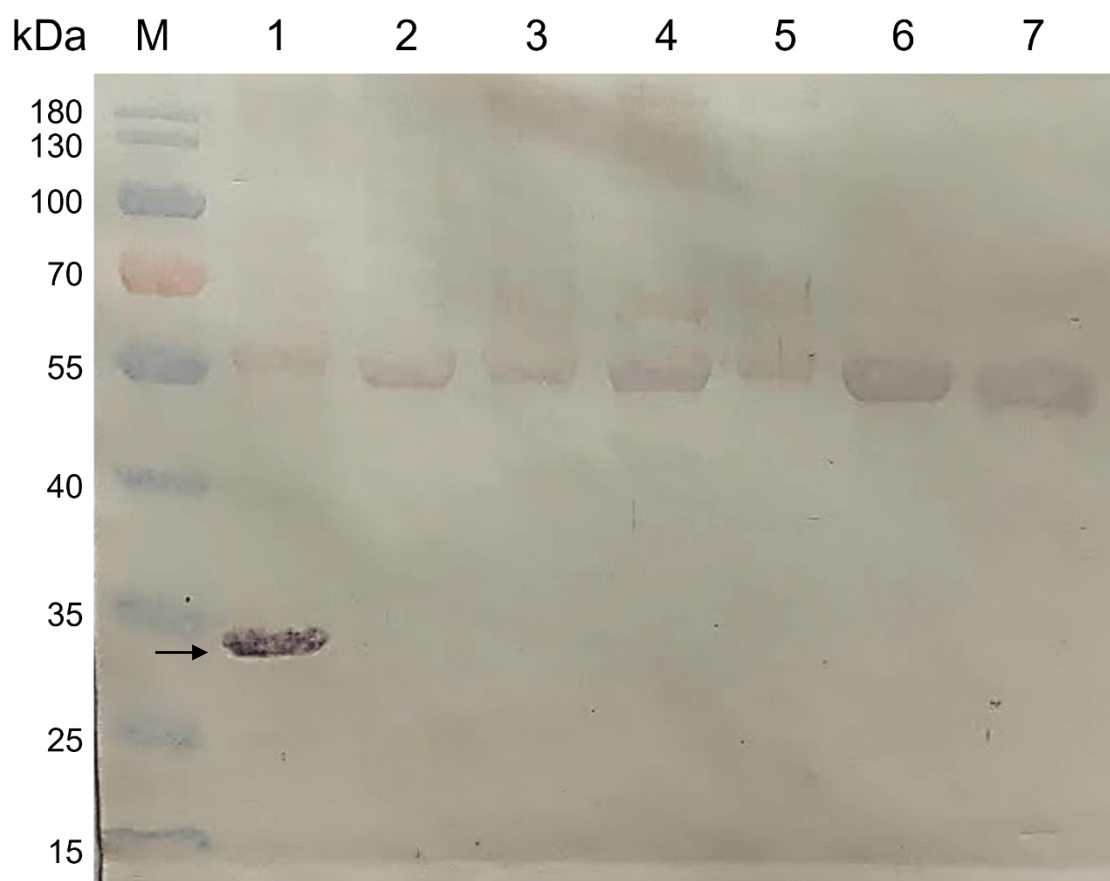


Figura 2.5: *Western blotting* (com anti-CP) das folhas agroinfiltradas com mutantes (1) PepRSV Ag1 Original; (2) *ORFN1/HIS-N*; (3) *ORFN1/HIS-C*; (4) KO *ORFN1*; (5) Δ CP; (6) *ORFN1/mCherry*; (7) *ORFN1/mGFP*.

2.3.5 *ORFN1* está associada ao Reticulo Endoplasmático

Para determinar a localização intracelular da *ORFN1*, a evidência experimental da expressão da proteína *ORFN1* fusionada a proteína GFP foi fornecida por microscopia confocal mostrando sua localização dentro da célula. Foi possível observar que a *ORFN1* fusionada a GFP produziu rearranjos condizentes com as estruturas do RE, que foi marcado com a proteína de fluorescência mCherry. Com isso, foi possível observar uma co-localização das proteínas de fluorescência

nas regiões em amarelo (Figura 2.6), indicando de que a *ORFN1* está associada ao RE.

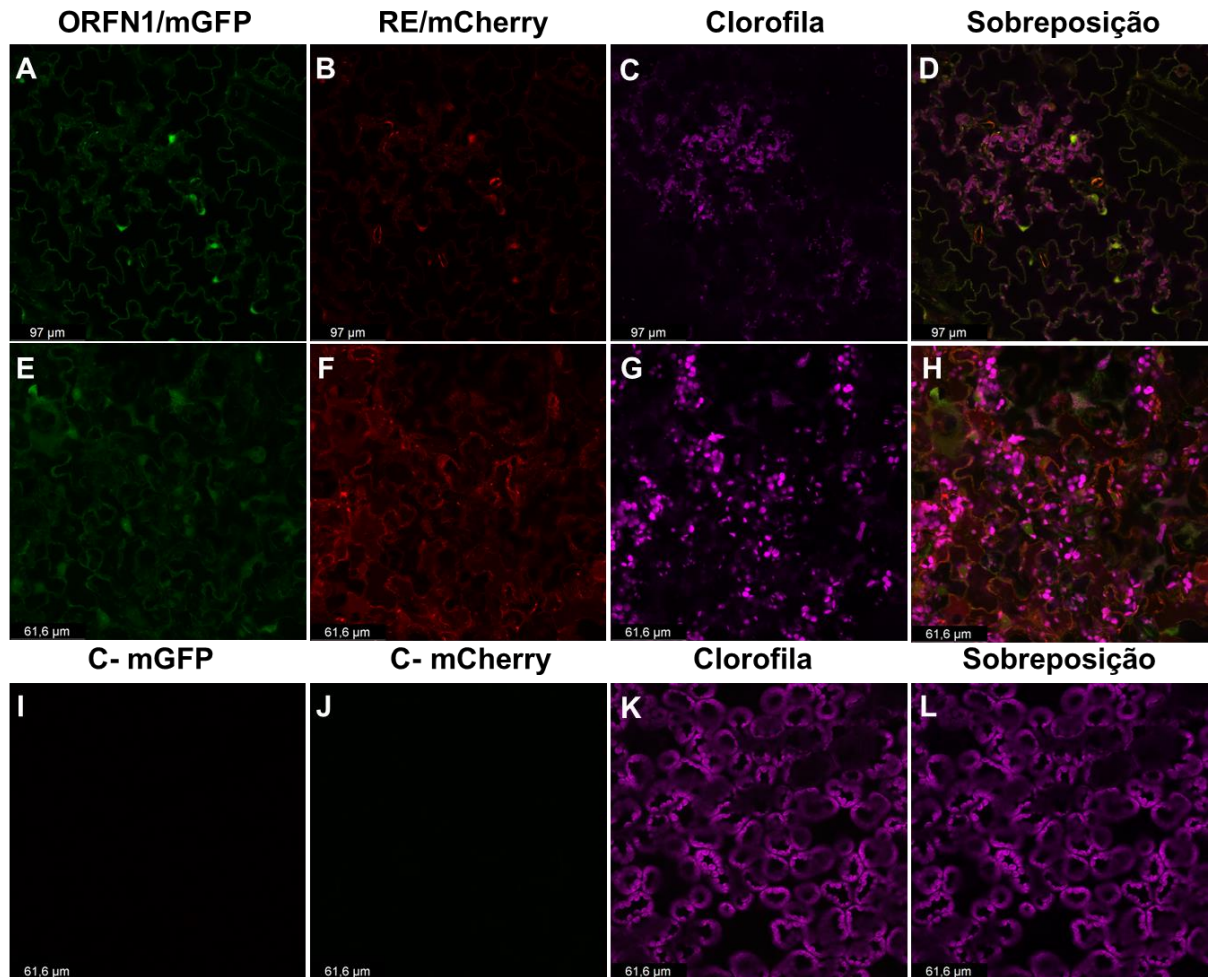


Figura 2.6: Imagens de microscopia confocal de células epidérmicas foliares de plantas *N. benthamiana*. Folhas co-infiltradas com proteína *ORFN1* fusionada a proteína GFP (A e E) e marcador de retículo endoplasmático marcado com a proteína mCherry (B e F) quatro dias após a infiltração (dpi) obtidos sob uma objetiva de imersão em água de 63 x. (C, G e K) autofluorescência de cloroplasto mostrado em rosa e (D, H e L) sobreposição de sinais. Controles negativos para mGFP (I) e mCherry (J).

2.4 Discussão

Um dos principais objetivos deste trabalho foi a confirmação de expressão da *ORFN1* e a caracterização de *ORFN1* mutantes. Para tanto, várias metodologias foram testadas, como a produção de antissoro para imunomarcação da *ORFN1*, expressão da *ORFN1* em vetor bacteriano de expressão pET28a no sistema bacteriano e em *N. benthamiana* utilizando o vetor de PepRSV. porém, não foi possível observar a expressão da proteína. O antissoro foi produzido com peptídeo sintético de terminal C de *ORFN1* (CTMTNSIRKLLTLPSLRGSRLRI) ligado com carreador, mas o antissoro produzido não se mostrou satisfatório ou eficiente em relação à especificidade. Entretanto, não foi possível observar a expressão da proteína nesses experimentos. Um antissoro foi produzido com peptídeo sintético da região C-terminal de *ORFN1* (CTMTNSIRKLLTLPSLRGSRLRI) ligado com carreador, porém o antissoro produzido não demonstrou alta especificidade.

Outro ponto que também prejudicou na observação da expressão da *ORFN1* foi sua baixa expressão em plantas, quando os mutantes *ORFN1*/GFP foram agroinfiltrados com seringa, os resultados de *Western blotting* foram negativos para a detecção com o antissoro anti-GFP. Na tentativa de observar a expressão em microscopia confocal, os pontos de fluorescência foram muito fracos. Apenas quando a agroinfiltração foi realizada em planta inteira a vácuo, atingindo todas as células da folha, é que foi possível confirmar sua expressão por *Western blotting* e ficou claro os padrões de fluorescência na microscopia confocal.

Com relação aos mutantes, quando agroinfiltrado em plantas, todos induziram sintomas severos de bolhosidade e encarquilhamento, demonstrando que as

modificações feitas não afetaram na infectividade sistêmica do vírus, incluindo o mutante de deleção da capa proteica. Os sintomas mais curiosos foram os produzidos pelos mutantes *ORFN1/HIS-C*, que induziu fenótipo de lesão local necrótica, e o mutante nocaute (KO) de *ORFN1* que induziu sintomas de murcha e tombamento, principalmente na região do caule. Esses sintomas podem ser uma resposta semelhante de hipersensibilidade (*hypersensitive-like response*), uma forma de morte celular programada, que restringe o patógeno ao local da infecção impedindo que ele se espalhe pela planta (Nürnberg et al., 2004). Esses sintomas podem indicar que a mutação realizada na *ORFN1*, e até mesmo o seu nocaute, podem afetar a estabilidade das estruturas terciárias e quaternárias, influenciando no reconhecimento pelo hospedeiro e desencadeando resposta de hipersensibilidade (Ehrenfeld et al., 2008). Foi demonstrado anteriormente que o PepRSV pode infectar sistemicamente plantas de *N. benthamiana* somente com o RNA-1 (Taraves-Esashika, 2020), o que dificulta a interpretação do papel do produto da *ORFN1* no ciclo de infecção sistêmica viral.

Fitovírus de RNA de cadeia positiva são conhecidos por recrutar endomembranas para a formação de vesículas que fornecem ambientes protetores e superfícies ampliadas não apenas para replicação do genoma viral, tradução e montagem de partículas, mas também para movimento intracelular e célula-a-célula (Armas-Rillo, De et al., 2016; Jiang & Laliberte, 2016). Em estudos anteriores, várias proteínas virais associadas ao sistema de membranas do RE e que induzem estresse de RE em plantas também foram relatadas atuando na regulação da expressão gênica associada a UPR (unfolded protein response) (Ye et al., 2013; Zhang et al., 2015; Lu et al., 2016; Gayral et al., 2020). No presente estudo, foi

observado que *ORFN1* é uma proteína associada ao RE. Além disso, construções nocaute da *ORFN1* induziram sintomatologia distinta da produzida por clones expressando a *ORFN1* em plantas de *N. benthamiana*. Estudos mais aprofundados são necessários para confirmar se esta proteína pode estar envolvida na ativação de fatores de transcrição (bZIP17, bZIP28 e bZIP60) e no mecanismo de ativação da UPR, e seu sistema de sinalização de proteínas desdobradas durante o estresse do RE (Liu et al., 2012; Angelos et al., 2017). A interação destes fatores de transcrição e a *ORFN1* podem estar associados a uma resposta UPR para uma diminuição do acúmulo de partículas virais (Herath et al., 2020). Além disso, a expressão da proteína da capa parece ter sido inibida em todas as construções mutantes avaliadas aqui, sendo necessário mais estudo para avaliar a importância da *ORFN1* na produção da capa proteica.

2.5 Conclusão

Neste capítulo concluímos que a expressão de *ORFN1* foi indiretamente demonstrada, e a proteína de *ORFN1* está associada ao RE, com a expressão dessa proteína estando possivelmente relacionada com a resposta da planta a infecção viral, onde sintomas mais severos como lesão local e morte celular programada são observados sob condições de infecção com vírus contendo mutações na *ORFN1*. Para saber os mecanismos envolvidos na interação dessa proteína com a planta são necessários mais estudo com relação ao mecanismo de ativação da UPR. Portanto, são necessárias técnicas mais elaboradas como plantas de *N. benthamiana* transgênicas para estudos semelhantes aos feitos envolvendo fatores de transcrição (bZIP17, bZIP28 e bZIP60) em *Arabidopsis thaliana*.

2.6 Referências

ADAMS, M.J.; HEINZE, C.; JACKSON, A.O.; KREUZE, J.F.; MACFARLANE, S.A. AND; TORRANCE, L. Virgaviridae. In: **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. International Union of Microbiological Societies – Virology Division. London: Elsevier, v.8, p.1462, 2012. DOI: 10.1016/b978-0-12-384684-6.00097-5.**

ANGELOS, E.; RUBERTI, C.; KIM, S.J.; BRANDIZZI, F. Maintaining the factory: the roles of the unfolded protein response in cellular homeostasis in plants. **The Plant Journal**, v.90, p.671–682, 2017. DOI: 10.1111/TPJ.13449.

ARMAS-RILLO, L. DE; VALERA, M.S.; MARRERO-HERNÁNDEZ, S.; VALENZUELA-FERNÁNDEZ, A. Membrane dynamics associated with viral infection. **Reviews in Medical Virology**, v.26, p.146–160, 2016. DOI: 10.1002/RMV.1872.

BATISTA, A.R.S.; NICOLINI, C.; RODRIGUES, K.B.; MELO, F.L.; VASQUES, R.M.; MACÊDO, M.A. DE; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T. Unique RNA 2 sequences of two Brazilian isolates of Pepper ringspot virus, a tobnavirus. **Virus Genes**, v.49, p.169–173, 2014. DOI: 10.1007/s11262-014-1066-8.

BERGH, S.T.; KOZIEL, M.G.; HUANG, S.C.; THOMAS, R.A.; GILLEY, D.P.; SIEGEL, A. The nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-2 (CAM strain). **Nucleic Acids Research**, v.13, p.8507, 1985. DOI: 10.1093/NAR/13.23.8507.

BLAWID, R.; NAGATA, T. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. **Journal of Virological Methods**, v.222, p.11–15, 2015. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.05.003.

BUCHER, E.; SIJEN, T.; HAAN, P. DE; GOLDBACH, R.; PRINS, M. Negative-Strand Tospoviruses and Tenuviruses Carry a Gene for a Suppressor of Gene Silencing at Analogous Genomic Positions. **Journal of Virology**, v.77, p.1329, 2003. DOI: 10.1128/JVI.77.2.1329-1336.2003.

EHRENFELD, N.; GONZALEZ, A.; CAÑÓN, P.; MEDINA, C.; PEREZ-ACLE, T.; ARCE-JOHNSON, P. Structure-function relationship between the tobamovirus TMV-

Cg coat protein and the HR-like response. **Journal of General Virology**, v.89, p.809–817, 2008. DOI: 10.1099/VIR.0.83355-0/CITE/REFWORKS.

GAYRAL, M.; ARIAS GAGUANCELA, O.; VASQUEZ, E.; HERATH, V.; FLORES, F.J.; DICKMAN, M.B.; VERCHOT, J. Multiple ER-to-nucleus stress signaling pathways are activated during *Plantago asiatica* mosaic virus and Turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.103, p.1233–1245, 2020. DOI: 10.1111/TPJ.14798.

GIBSON, D.G.; YOUNG, L.; CHUANG, R.Y.; VENTER, J.C.; HUTCHISON, C.A.; SMITH, H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods** 2009 6:5, v.6, p.343–345, 2009. DOI: 10.1038/nmeth.1318.

GOULDEN, M.G.; LOMONOSSOFF, G.P.; WOOD, K.R.; DAVIES, J.W. A model for the generation of tobacco rattle virus (TRV) anomalous isolates: pea early browning virus RNA-2 acquires TRV sequences from both RNA-1 and RNA-2. **The Journal of general virology**, v.72 (Pt 7), p.1751–1754, 1991. DOI: 10.1099/0022-1317-72-7-1751.

HAMILTON, W.D.; BOCCARA, M.; ROBINSON, D.J.; BAULCOMBE, D.C. The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-1. **The Journal of general virology**, v.68 (Pt 10), p.2563–2575, 1987. DOI: 10.1099/0022-1317-68-10-2563.

HERATH, V.; GAYRAL, M.; MILLER, R.K.; VERCHOT, J. **BIP and the unfolded protein response are important for potyvirus and potexvirus infection** *Plant Signaling and Behavior* Bellwether Publishing, Ltd., , 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15592324.2020.1807723>>. Acesso em: 19 mar. 2021

HUGHES, G.; DAVIES, J.W.; WOOD, K.R. In vitro translation of the bipartite genomic RNA of pea early browning virus. **Journal of General Virology**, v.67, p.2125–2133, 1986. DOI: 10.1099/0022-1317-67-10-2125.

JIANG, J.; LALIBERTE, J.F. Membrane association for plant virus replication and movement. **Current Research Topics in Plant Virology**, p.67–85, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-32919-2_3/COVER.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Association of Pepper Ringspot Virus (Brazilian Tobacco Rattle Virus) and Host Cell Mitochondria. **Journal of General Virology**, v.4, p.177–181, 1969. DOI: 10.1099/0022-1317-4-2-177.

KOONIN, E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. **The Journal of general virology**, v.72 (Pt 9), p.2197–2206, 1991. DOI: 10.1099/0022-1317-72-9-2197.

LIU, Y.; BURGOS, J.S.; DENG, Y.; SRIVASTAVA, R.; HOWELL, S.H.; BASSHAM, D.C. Degradation of the Endoplasmic Reticulum by Autophagy during Endoplasmic Reticulum Stress in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.24, p.4635–4651, 2012. DOI: 10.1105/TPC.112.101535.

LU, Y.; YIN, M.; WANG, X.; CHEN, B.; YANG, X.; PENG, J.; ZHENG, H.; ZHAO, J.; LIN, L.; YU, C.; MACFARLANE, S.; HE, J.; LIU, Y.; CHEN, J.; DAI, L.; YAN, F. The unfolded protein response and programmed cell death are induced by expression of Garlic virus X p11 in *Nicotiana benthamiana*. **Journal of General Virology**, v.97, p.1462–1468, 2016. DOI: 10.1099/JGV.0.000460.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v.198, p.249–266, 2004. DOI: 10.1111/J.0105-2896.2004.0119.X.

ROZANOV, M.N.; KOONIN, E. V.; GORBALENYA, A.E. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the “Sindbis-like” supergroup of positive-strand RNA viruses. **The Journal of general virology**, v.73 (Pt 8), p.2129–2134, 1992. DOI: 10.1099/0022-1317-73-8-2129.

TAVARES-ESASHIKA, M.L. **CONSTRUÇÃO DO CLONE INFECCIOSO E VETOR VIRAL DE PEPPER RINGSPOT VIRUS**. 2021. 114p. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA,

YE, C.M.; CHEN, S.; PAYTON, M.; DICKMAN, M.B.; VERCHOT, J. TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death. **Molecular Plant Pathology**, v.14, p.241–255, 2013. DOI: 10.1111/mp.12000.

ZHANG, L.; CHEN, H.; BRANDIZZI, F.; VERCHOT, J.; WANG, A. The UPR Branch

IRE1-bZIP60 in Plants Plays an Essential Role in Viral Infection and Is Complementary to the Only UPR Pathway in Yeast. **PLoS Genetics**, v.11, 2015. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005164.

