

Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Ocorrência e caracterização molecular de isolados de allexivirus em baunilhas no Brasil

Gustavo Pereira Felix

Brasília
2025

Dedico este trabalho, à minha família, minha
companheira, amigos e professores, sem vocês eu não seria
o que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo.

A minha companheira de vida Ariel, por me dar apoio nos momentos difíceis e por compartilhar os bons momentos da vida e seguir sempre me incentivando a continuar lutando.

A minha família, meus pais Hermes e Maria, e meus irmãos Rafael e Dorneles, que sempre me apoiaram, me deram suporte em tudo e sempre acreditaram em mim, mesmo morando em outro estado durante a graduação e mestrado, eu sempre pude contar com eles, sem eles eu não seria o que sou hoje.

A meus amigos de vida de São Paulo (em especial o Antônio, Luiz e Lúcia), que também carregam no peito, e meus amigos que ganhei na Biologia (Fernando, Caio, Igor, Walber) todos colaboraram de alguma forma, seja por conversas, debates, um ombro amigo.

A meus professores da educação básica de São Paulo, e meus professores da graduação e mestrado pelos ensinamentos, conselhos e exemplos de vida e profissional.

A meus colegas e amigos de laboratório Bruna, Ana Clara, Jorge, Matheus, Andressa e em especial a Andreza por todos os conselhos e vivências dessa trajetória.

A minha orientadora desde a época de bolsista PIBIC durante a graduação e co-orientadora no mestrado, Simone Ribeiro, por todos os ensinamentos, apontamentos, suporte, confiança e muita paciência e tempo investido em mim.

Ao meu orientador Daniel Ardisson, por acreditar no meu potencial, ter confiança e me dar confiança e por ter me acolhido de braços abertos para me ensinar e orientar no decorrer do mestrado.

A Universidade de Brasília por ter me formado um profissional e por participar relevantemente também na minha formação pessoal.

A CNPQ e UnB pelo apoio financeiro para realização do mestrado.

Aos membros da banca examinadora Dra. Andreza Vidal, Dr. Márcio Sanches e Dra. Rita de Cássia pela honra de aceitarem o convite para participarem da minha banca e pelas respectivas contribuições neste trabalho.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

A baunilha (*Vanilla* spp.) é uma orquídea de grande importância econômica, cultivada e comercializada mundialmente por seus frutos aromáticos de alto valor. Entre mais de 100 espécies descritas do gênero, cerca de 30 ocorrem no Brasil, das quais 15 produzem frutos aromáticos. Apesar do elevado potencial comercial e da atratividade do mercado, o país ainda carece de tradição no cultivo dessa orquídea. A Embrapa mantém o Banco Ativo de Germoplasma de Baunilha (BAG-Baunilha), que reúne cerca de 160 acessos de diferentes espécies do gênero *Vanilla*. Entre os principais desafios fitossanitários da cultura destacam-se as doenças causadas por vírus, capazes de gerar perdas significativas na produção. Contudo, até o momento, não havia registros de infecções virais em *Vanilla* no Brasil. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de vírus de RNA em baunilhas brasileiras por meio de sequenciamento de alto desempenho (HTS), buscando compreender os vírus que infectam as plantas e a rede de interações que sustentam a diversidade viral. Dados de sequenciamento de *pools* de amostras do BAG-Baunilha foram analisados com ferramentas de bioinformática, incluindo Geneious e BLAST. A análise do *pool* de *V. planifolia* revelou 60 *contigs* com alta identidade ao Vanilla latent virus (VLV; *Allexivirus latensvanillae*, família *Alphaflexiviridae*). As análises de BLASTx e BLASTn indicaram dois grupos: um majoritário, com identidades superiores a 90% em relação ao VLV, denominado VLV-BR2, e outro com menores identidades, sugerindo uma variante distinta, VLV-BR1. *Contigs* representando genomas quase completos foram obtidos para ambas as variantes, exibindo códon de iniciação alternativos no gene da *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp), característica comum em *Allexivirus*. A presença das duas variantes foi confirmada por RT-PCR em amostras do BAG-Baunilha e de coletas da Embrapa nos estados do Pará e da Bahia. Mono-infecções por VLV-BR2 foram detectadas em 8 das 47 amostras de *Vanilla* (*V. cf. odorata*, *V. cf. hartii*, *V. planifolia* e *V. sp.*) e por VLV-BR1 em 7 amostras (*V. planifolia* e *V. phaeantha*). Houve coinfeção em uma amostra de *V. planifolia* e 100% de infecção por VLV-BR1 em mudas clonais derivadas de uma amostra positiva do BAG-Baunilha (*V. planifolia*). A transmissão mecânica do VLV-BR2 foi obtida experimentalmente em *Nicotiana benthamiana* (1/17). Este estudo representa o primeiro registro do Vanilla latent virus (VLV) no Brasil sob a forma de duas variantes, VLV-BR1 e VLV-BR2, e documenta sua ocorrência em novos hospedeiros do gênero *Vanilla* (*V. cf. odorata*, *V. cf. hartii* e *V. phaeantha*).

ABSTRACT

Vanilla (*Vanilla spp.*) is an orchid of great economic importance, cultivated and traded worldwide for its high-value aromatic fruits. Of the more than 100 described species of the genus, approximately 30 occur in Brazil, of which 15 produce aromatic fruits. Despite the high commercial potential and market attractiveness, the country still lacks a tradition in cultivating this orchid. Embrapa maintains the Active Vanilla Germplasm Bank (BAG-Baunilha), which brings together approximately 160 accessions of different species of the *Vanilla* genus. Among the main phytosanitary challenges facing the crop are diseases caused by viruses, which can cause significant production losses. However, to date, there have been no records of viral infections in vanilla in Brazil. The objective of this study was to investigate the presence of RNA viruses in Brazilian vanilla plants using high-throughput sequencing (HTS), seeking to understand the viruses that infect the plants and the network of interactions that sustain viral diversity. Sequencing data from BAG-Baunilha sample pools were analyzed with bioinformatics tools, including Geneious and BLAST. Analysis of the *V. planifolia* pool revealed 60 contigs with high identity to Vanilla latent virus (VLV; *Allexivirus latensvanillae*, family *Alphaflexiviridae*). BLASTx and BLASTn analyses indicated two groups: a major group with identities greater than 90% to VLV, designated VLV-BR2, and another with lower identities, suggesting a distinct variant, VLV-BR1. Contigs representing nearly complete genomes were obtained for both variants, exhibiting alternative initiation codons in the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, a common feature in *Allexiviruses*. The presence of both variants was confirmed by RT-PCR in samples from the BAG-Baunilha and from Embrapa collections in the states of Pará and Bahia. Mono-infections with VLV-BR2 were detected in 8 of the 47 *Vanilla* samples (*V. cf. odorata*, *V. cf. hartii*, *V. planifolia* and *V. sp.*) and with VLV-BR1 in 7 samples (*V. planifolia* and *V. phaeantha*). There was coinfection in one *V. planifolia* sample and 100% infection with VLV-BR1 in clonal seedlings derived from a positive sample of BAG-Baunilha (*V. planifolia*). Mechanical transmission of VLV-BR2 was obtained experimentally in *Nicotiana benthamiana* (1/17). This study represents the first record of Vanilla latent virus (VLV) in Brazil in the form of two variants, VLV-BR1 and VLV-BR2, and documents its occurrence in new hosts of the genus *Vanilla* (*V. cf. odorata*, *V. cf. hartii* and *V. phaeantha*).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Faturamento da produção de baunilha. (A) Faturamento em milhões dólares da comercialização de baunilha por país produtor em 2021. (B) Porcentagem do faturamento da comercialização de baunilha em 2021 por país.	16
Figura 2: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) de vírus do gênero <i>Potexvirus</i> . RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), TGB1, 2 e 3 (Triple gene block 1, 2 e 3), CP (Capa proteica). Fonte: ViralZone.....	20
Figura 3: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) vírus do gênero <i>Allexivirus</i> . RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), TGB1 e 2 (Triple gene block 1 e 2), CP (Capa proteica) ORF4 e ORF6 (open reading frame). Fonte: ViralZone.	22
Figura 4: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) vírus do gênero <i>Tobamovirus</i> . Small replicase subunit, ORF 2, 3 e 4. RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) 1; RNAs subgenômicos com MP (proteína de movimento) e CP (Capa proteica). Fonte:ViralZone. ...	23
Figura 5: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) vírus do gênero <i>Cucumovirus</i> . RNA-1 com ORF1a; RNA-2 com ORF2a e ORF2b; RNA-3 com ORF3a codificando para MP (Proteína de movimento) e ORF3b codificando para sgRNA-4 com CP (Capa proteica). Fonte:ViralZone.	24
Figura 6: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) vírus do gênero <i>Potyvirus</i> . Poliproteína codificando para P1-pro (Proteína 1 Protease), HC-pro (Helper component-protease), P3 (Proteína 3), CI (Cylindrical inclusion protein), VPg (viral protein genome-linked), NIa-pro (nuclear inclusion a-protease), NIb-RdRp (inclusão nuclear b - RNA polimerase dependente de RNA), CP (capa proteica) e P3N-PIPO (Pretty interesting <i>Potyviridae</i> ORF), M (proteína de movimento M). Fonte: ViralZone.....	25
Figura 7: Plantas mantidas no BAG Baunilha da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (A) Cultivo de diferentes espécies de baunilha sob tela de sombreamento com suportes inertes e canteiros com matéria orgânica e sistema de irrigação automático. (B) e (C) Vagem (ou fava) de <i>Vanilla pompona</i>	26
Figura 8: Mudanças de baunilhas propagadas in vitro antes de aclimatização.	37
Figura 9: Aclimação de mudas de <i>Vanilla planifolia</i> cultivadas in vitro.	37
Figura 10: Processo de inoculação mecânica. (A) Maceração de folha (fonte de inóculo) com pistilo e cadinho de cerâmica e nitrogênio líquido. (B) Mistura de folha macerada com tampão de inoculação e (C) Aplicação de extrato sob a superfície das folhas de plantas sadias de diferentes espécies.	38
Figura 11: Organização genômica das variantes VLV-CRV2148ALL, VLV-BR1 e VLV-BR2. RdRp- RNA dependente de polimerase, TGB1 – Triple Gene Block 1 em, TGB2 – Triple Gene Block 2, TGB3 – Triple Gene Block 3, P40 e CP – Capa proteica.	41
Figura 12: Eletroforeses em géis de agarose 0,9% de RNA Total amostras de baunilha. (A) RNA Total de amostras <i>Vanilla planifolia</i> (2661 a 2666) e <i>Vanilla cribbiana</i> (2667 e 2668). (B) RNA Total de amostras de <i>Vanilla planifolia</i> (2689 a 2693) e <i>Vanilla phaeantha</i> (2694 a 2698) M = Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco).	42
Figura 13: Eletroforeses de géis de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 (Allexivirus_CP_F/Allexivirus_CP_R) e VLV-BR2	

(VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R) nos pools de RNA de *Vanilla*: P1 = Pool de *V. chamossonis*; P2 = Pool de *V. phaeantha*; P3 = Pool de *V. planifolia*; P4 = Pool de *V. columbiana*; P5 = Pool de *V. pompona*; M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle Negativo; C-2 = cDNA de Feijão; C+ = controle positivo.43

Figura 14: Eletroforeses de géis de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 e VLV-BR2 nas amostras do pool de *V. planifolia* e *V. cribbiana*. 2661 a 2666 = *V. planifolia*; 2667 e 2668 = *V. cribbiana*; M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle Negativo (cDNA de feijão); C + = Controle positivo.44

Figura 15: Eletroforeses de géis de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 e VLV-BR2 nas amostras do Pará. M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle negativo (Água); C + = Controle positivo (cDNA do pool de *V. planifolia*).45

Figura 16: Eletroforeses de géis de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 e VLV-BR2 nas amostras de coleções biológicas da Embrapa Cerrados de diferentes espécies de *Vanilla*. M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle negativo (Água); C + = Controle positivo (cDNA do pool de *V. planifolia*). .45

Figura 17: Eletroforese de gel de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 em matrizes das espécies *Vanilla planifolia* e *Vanilla phaeantha* cultivadas *in vitro*. (A) RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR2. (B) RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1. M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle negativo (Água); C + = Controle positivo (cDNA do pool de *V. planifolia*).46

Figura 18: Eletroforese de gel de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 nas mudas clonais da obtidas da matriz *Vanilla planifolia* 2689.47

Figura 19: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos correspondentes ao genoma completo do VLV - CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.48

Figura 20: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos [CP (nt)] e aminoácidos [CP (aa)] correspondentes a CP de VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros isolados sequenciadas nesse trabalho e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.50

Figura 21: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a RdRp VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.51

Figura 22: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a TGB1 VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.52

Figura 23: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a TGB2 VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-

BR2 e outros membros do gênero <i>Allexivirus</i> . A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.	53
Figura 24: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a TGB3 VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero <i>Allexivirus</i> . A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.	54
Figura 25: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a P40 VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero <i>Allexivirus</i> . A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.....	55
Figura 26: Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança enraizadas das sequências de nucleotídeos do genoma completo (A), capa proteica (B), e da sequência de aminoácidos da proteína da capa (C) do VLV-BR1 e VLV-BR2 e vírus exemplares que compõe o gênero <i>Allexivirus</i> . A árvore foi gerada no iqtree-2.3.6-Windows com 1.000 réplicas de bootstrap ultrarrápidas e a opção "encontrar e aplicar o melhor modelo". Apenas os valores de suporte de ramificação acima de 50% são mostrados. Todos os números de acesso usados para construir a árvore estão listados na tabela 4.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vírus relatados infectando diferentes espécies de <i>Vanilla</i>	18
Tabela 2: Amostras de <i>Vanilla</i> sp. coletadas neste estudo e descrição de origem e ano de coleta.	27
Tabela 3: Primers utilizados neste estudo para confirmação da presença do VLV em amostras de <i>Vanilla</i> sp.	31
Tabela 4: Acessos de sequências de <i>Allexivirus</i> utilizados nas análises filogenéticas.....	34
Tabela 5: Sequências obtidas neste trabalho por sequenciamento Sanger de clones positivos.	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	12
3. JUSTIFICATIVA	13
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
4.1 A cultura da baunilha	13
4.2. Principais vírus em baunilhas.....	17
4.2.1. <i>Potexvirus</i>	20
4.2.2. <i>Allexivirus</i>	21
4.2.3. <i>Tobamovirus</i>	22
4.2.4. <i>Cucumovirus</i>	23
4.2.5. <i>Potyvirus</i>	24
5. METODOLOGIA	25
5.1. Coleta de amostras	25
5.2. Extração de RNA Total	29
5.3. Sequenciamento HTS e análise de bioinformática.....	29
5.4. Desenho de primers específicos	30
5.5. Validação do HTS e detecção de vírus por RT-PCR	32
5.6. Sequenciamento Sanger	33
5.7. Análise genômica e filogenética	34
5.8. Avaliação de matrizes cultivadas <i>in vitro</i>	36
5.9. Caracterização biológica e ensaios de inoculação mecânica	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1. Sequenciamento HTS e análise da biblioteca de <i>V. planifolia</i>	39
6.2. Predição genômica dos genomas de Vanilla latent virus, variantes VLV-BR1 e VLV-BR2.....	40
6.3. Detecção de VLV-BR1 e VLV-BR2 nas amostras de espécies de <i>Vanilla</i>	41
6.4. Caracterização e filogenia das variantes VLV-BR1 e VLV-BR2.....	47
6.5. Caracterização biológica do VLV-BR1 e VLV-BR2.....	58
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	60
9. REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma família botânica bastante diversa e considerada uma das maiores famílias de plantas até então descritas. Possui cerca de 837 gêneros com mais de 33.000 espécies (BÁNKI, 2025), com ocorrência majoritária em regiões tropicais e subtropicais (CHASE et al., 2015). As orquídeas possuem vasta importância econômica, sendo utilizadas em diversos setores como agro alimentício, produtos medicinais e etnobotânica, cosméticos, horticultura e perfumaria (HINSLEY et al., 2018).

A baunilha é uma das especiarias naturais mais apreciadas mundialmente com alto valor agregado e pertence ao gênero *Vanilla*, família Orchidaceae. O Brasil comporta a maior diversidade de baunilhas do mundo, com 30 das 110 espécies já descritas. Dentre essas, 15 apresentam potencial aromático (BIANCHETTI et al., 2023). A produção comercial de baunilha é feita principalmente a partir de frutos de *V. planifolia* e, em menor escala, de *V. pompona* e *Vanilla × tahitensis*. Embora *V. planifolia* seja originária do México, de onde foi distribuída globalmente, o maior produtor e exportador mundial de baunilha é Madagascar, com grande relevância na economia local (KACUNGIRA, 2018). Madagascar possui cerca de 70% de todo o mercado global, e um faturamento de 692 milhões de dólares em 2020. (FAOSTAT, 2025). Por outro lado, o Brasil não tem tradição no cultivo da baunilha, embora já existam algumas iniciativas como a *Vanilla* Brasil, alguns pequenos produtores no sul da Bahia e também no estado de São Paulo, e algumas experiências no Pará (HOMMA et al., 2006; MANS, 2022), além de alguns pequenos produtores no DF e entorno com o apoio e orientação da EMATER (JORNAL DE BRASÍLIA, 2023).

A baunilha é a segunda especiaria mais cara do mundo e tem alto potencial de comercialização no Brasil. Entretanto, informações acerca de espécies endêmicas de baunilha no Brasil são escassas. Devido à importância econômica da baunilha e seu potencial de cultivo no país, foi criado o primeiro banco ativo de germoplasma de baunilhas do Brasil e o único do mundo a reunir um volume significativo de espécies da América do Sul (HEBERLÊ, 2022a). O BAG Baunilha é hospedado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e conta com mais de 160 acessos e algumas dessas plantas apresentam sintomas, como mosaico e deformação foliar, que podem ser ocasionados por vírus.

As orquídeas apresentam diversos problemas fitossanitário que podem causar perdas econômicas significativas. Entre os principais problemas fitossanitários estão aqueles causados por vírus. Existem mais de 58 diferentes vírus pertencentes a diversas famílias virais que infectam espécies de orquídeas e podem representar um gargalo na cadeia produtiva das

orquídeas (AJIKUTTIRA et al., 2002; ANGIRA et al., 2024). Dentre os vírus em baunilhas, já foram descritos 14 vírus em todo o mundo, todos de genoma de RNA. O primeiro relato foi em 1986 (WISLER et al., 1987) com os vírus Cymbidium mosaic virus (CymMV, *Potexvirus cymbidii*, família *Alphaflexiviridae*) e Odontoglossum ringspot virus (ORSV, *Tobamovirus odontoglossi*, família *Virgaviridae*).

Baunilhas infectadas podem apresentar sinais de infecção tais como manchas, mosaico e deformação foliar, distúrbios do crescimento e flores estéreis ou podem ser assintomáticas (RICHARD et al., 2009). Os problemas com viroses são maiores em locais com cultivo intensivo (BENEZET et al., 2000; MADHUBALA et al., 2005; RICHARD et al., 2009). Apesar da presença de vírus em orquídeas ter sido reportada no Brasil desde os anos 70 (KITAJIMA et al., 1974), há poucos relatos sobre a distribuição dos vírus em orquídeas no país (KLEIN, 2008; MORAES et al., 2017).

Os métodos de diagnose de vírus mais utilizados são métodos sorológicos e PCR, que são dependentes de algum conhecimento prévio do vírus em questão. Novas tecnologias baseadas em sequenciamento de alto desempenho (*High Throughput Sequencing* – HTS) vêm sendo aplicadas à virologia em todo o mundo, possibilitando a identificação e diagnose de vírus em diversas plantas, sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio do patógeno viral, inclusive já tendo sido aplicado na identificação de vírus em baunilhas (ALVES-FREITAS et al., 2019; CANDRESSE et al., 2014; VIDAL et al., 2021; VIDAL et al., 2023; ZHU et al., 2025). Com esse método, é possível a identificação de vírus já descritos, assim como novos vírus ainda não catalogados na literatura. Nos últimos anos, grupos de pesquisa da Embrapa e UnB tem utilizado HTS com bastante sucesso para o estudo de vírus em plantas nativas e cultivadas (ALVES-FREITAS et al., 2019; DE NAZARÉ ALMEIDA DOS REIS et al., 2020; LAMAS et al., 2016; MELO et al., 2014; SANCHES et al., 2015; VIDAL et al., 2021; VIDAL et al., 2023) e em insetos vetores e predadores (FONTENELE et al., 2018; GODINHO et al., 2017).

2. OBJETIVO

Investigar a presença de vírus de RNA em baunilhas brasileiras por meio de sequenciamento de alto desempenho (HTS), buscando compreender os vírus que infectam as plantas e a rede de interações que sustentam a diversidade viral presente em baunilhas brasileiras do BAG Baunilha, baunilhas de coleções particulares e em áreas produtoras.

3. JUSTIFICATIVA

O estudo dos vírus afetando baunilhas brasileiras no BAG Baunilha, mantido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e da coleção de baunilhas da Embrapa Cerrados no Distrito Federal, e em plantas oriundas de plantações comerciais, através do sequenciamento de alto desempenho permitirá a identificação da população dos vírus presentes nas plantas sem o conhecimento prévio do agente viral. Neste estudo, caracterizaremos o Vanilla latent virus (VLV). Os resultados gerados neste estudo poderão pavimentar informações necessárias para o desenvolvimento de métodos de diagnose e estratégias de manejo mais eficazes proporcionando uma produção mais sustentável e lucrativa, tendo em vista a crescente expansão e incentivo do cultivo da cultura de baunilha na região do DF (HEBERLÊ, 2022b; IESB, 2025; AGRO RECORD, 2025).

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 A cultura da baunilha

O nome baunilha tem origem do espanhol “vainilla”, cujo significado é um diminuto para bainha, que por sua vez é derivado do latim “vagina” (bainha de espada), o que remete ao aspecto alongado das vagens da baunilha (FOUCHÉ; JOUVE, 1999). A mesma é uma das especiarias naturais mais apreciadas mundialmente com alto valor agregado. Pertencente ao gênero *Vanilla*, essas plantas fazem parte da família Orchidaceae, e são desde orquídeas terrestres a trepadeiras, podendo germinar diretamente no solo (BIANCHETTI et al., 2023; AGRO RECORD, 2025). Seu fruto contém mais de 300 compostos químicos diferentes, mas um dos que torna a baunilha tão importante é um aldeído denominado vanilina, substância que promove o aroma característico da planta (BIANCHETTI et al., 2023).

As orquídeas em geral são plantas que ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Climas quentes e úmidos são o ambiente ideal para as baunilhas crescerem adequadamente (BIANCHETTI et al., 2023). Entre as orquídeas comestíveis, temos a baunilha sendo a mais conhecida em decorrência de seu aroma, entretanto flores de outras orquídeas podem ser utilizadas na alimentação (TABOH, 2014). Originária do sudeste do México, da Guatemala e outras regiões da América Central (HOMMA et al., 2006), registros datam a utilização da baunilha desde a civilização Asteca (BIANCHETTI et al., 2023).

Existem relatos que datam a utilização da baunilha na Europa em meados do século XVI. Sua cultura foi introduzida pelos franceses nas Ilhas Reunião (1793) e ilhas vizinhas como as Ilhas Maurício (1827), e posteriormente em Madagascar (1840) e Ilhas Seychelles (1866) (BIANCHETTI et al., 2023).

O cultivo de baunilha além de possuir condições climáticas específicas de plantio, também necessita de polinização, podendo ser manual para o caso das espécies introduzidas e que não possuem o polinizador nativo presente. Essa polinização artificial (manual) foi desenvolvida por um menino de 12 anos chamado Edmond Albius, escravizado das Ilhas Reunião em 1836, e ainda é utilizada nos tempos atuais. Consiste na exposição da antera (estrutura da flor onde fica o grão de pólen) e consequente contato, por alguns segundos, com o estigma da mesma flor para a efetivação da polinização (BIANCHETTI et al., 2023). Essa técnica potencializou a introdução e produção de baunilha em outras regiões onde ela não ocorre, sendo possível obter a polinização independente do polinizador natural.

A primeira floração pode levar cerca de 2 a 3 anos, e da floração para a colheita cerca de 8 a 9 meses. As plantas de baunilha têm uma vida útil média de 15 anos, sendo necessário novo plantio após esse período (HOMMA et al., 2006). Após a colheita dos frutos, é feita o processo de cura, um tipo de fermentação lenta, que pode levar cerca de 3 meses a depender do tamanho da vagem. Dependendo da espécie, uma planta de baunilha floresce apenas uma vez ao ano, tornando o processo produtivo escasso, e tornando o produto extremamente valorizado, o qual possui cotações que variam entre US\$400 a US\$450 o quilo (BIANCHETTI et al., 2023). A cotação do quilo pode variar muito de ano para ano, em decorrência das instabilidades das produções principalmente de Madagascar e Indonésia.

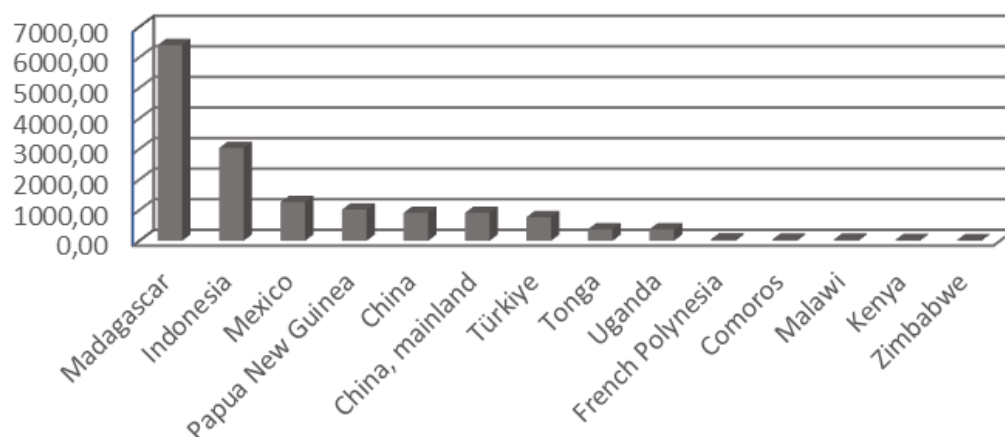
Cerca de 90% da baunilha comercializada é dedicada para a indústria agro alimentícia (BIANCHETTI et al., 2023). É estimado que apenas 1% dos produtos aromatizados de baunilha sejam produzidos com produtos da planta propriamente, sendo grande parte do comércio advindos do aroma sintético. Todavia a grande maioria da produção de baunilha é provenientes de sistemas de cultivo extensivo (BIANCHETTI et al., 2023).

Cerca de 130 espécies, do gênero *Vanilla*, já foram descritas (BÁNKI, 2025; RODOLPHE et al., 2011) com 30 delas apresentando potencial aromático no mundo, sendo que 15 ocorrem no Brasil, logo com potencial para a sua comercialização (BIANCHETTI et al., 2023). A distribuição das espécies de baunilha se localiza em praticamente todos os países que compõem a faixa tropical no mundo todo (entre 27°C Norte e Sul). O Brasil, é o país com maior diversidade de espécies aromáticas (MOTTA, 2024), com a ocorrência de 30 espécies de *Vanilla* e metade delas com potencial aromático (MENEGUZZO, 2025).

A produção comercial é feita principalmente a partir de frutos de *Vanilla planifolia* e, em menor escala, de *Vanilla pompona* e *Vanilla tahitensis*. O maior produtor e exportador mundial de baunilha é Madagascar com um faturamento de 640 milhões de dólares em 2021 representando cerca de 42% de todo o faturamento do mercado global, (Figura 1A) e tendo grande relevância na economia local (FAOSTAT, 2025). Além de Madagascar, temos como importantes produtores da baunilha a Indonésia (19,88%), México (8,32%), Papua-Nova Guiné (6,69%), China (5,99%) entre outros (Figura 1B).

(A)

Faturamento em milhões de dólares de produção
de baunilha
(Ano de Referência 2021)

**(B)**

Porcentagem de faturamento

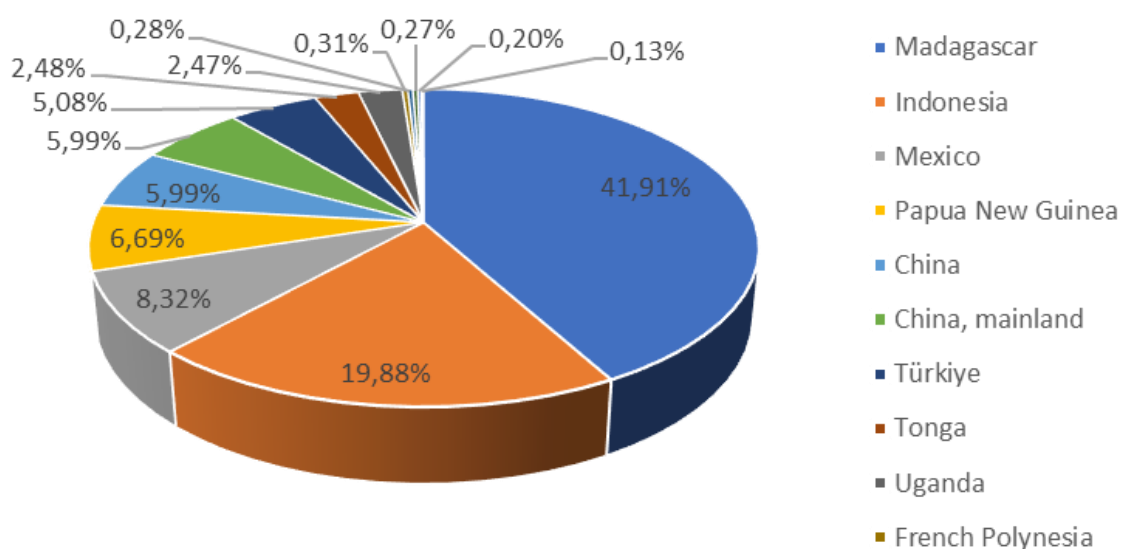


Figura 1: Faturamento da produção de baunilha. (A) Faturamento em milhões dólares da comercialização de baunilha por país produtor em 2021. (B) Porcentagem do faturamento da comercialização de baunilha em 2021 por país.

De acordo com o Meneguzzo (2025) um inventário da Flora Brasileira (em construção) 30 espécies do gênero *Vanilla* crescem no Brasil, sendo 13 endêmicas. Tendo em vista o interesse crescente na comercialização de baunilha produzida nacionalmente, a Embrapa desenvolve um projeto, que conta com o apoio do Ministério de Desenvolvimento Agrário (MDA), para intensificar os estudos dessa cultura. O projeto intitulado “Desenvolvimento da

cadeia produtiva de baunilhas brasileiras de importância para a gastronomia e agroindústria” coordena ações em busca de informações importantes relativas a baunilhas brasileiras para o estabelecimento de boas práticas de cultivo, melhora de sistema de produção, conhecimento sobre taxonomia, biologia e bioquímica das espécies de *Vanilla* brasileiras com potencial para indústria, extensão e potencial de produção das populações existentes, impacto da coleta de frutos sobre a dinâmica populacional, conservação de germoplasma, viabilização de produção clonal de mudas e avaliação dos problemas fitossanitários presentes no país (BIANCHETTI et al., 2023). Todas essas informações podem servir de base para produções mais sustentáveis e lucrativas.

Como alicerce para essa pesquisa, foi criado o primeiro Banco Ativo de Germoplasma de Baunilhas do Brasil e o único do mundo a reunir um volume significativo de espécies da América do Sul (HEBERLÊ, 2022a). O BAG Baunilha é hospedado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e conta com cerca de 160 acessos e algumas dessas plantas apresentam sintomas que podem ser ocasionados por vírus.

4.2. Principais vírus em baunilhas

Diversos vírus pertencentes principalmente às famílias *Alphaflexiviridae* e *Potyviridae* foram relatados em espécies de *Vanilla* (Tabela 1). O primeiro relato da ocorrência de vírus em baunilhas foi em 1986 (WISLER et al., 1987) com os vírus *Cymbidium mosaic virus* e *Odontoglossum ringspot virus*.

Posteriormente, foram relatados outros 13 vírus infectando *Vanilla*, incluindo *Vanilla mosaic virus* (VanMV, *Potyvirus dasheenii*, família *Potyviridae*) (BHAT et al., 2004; RICHARD et al., 2009), *dasheen mosaic virus* (DsMV, *Potyvirus dasheenii*, família *Potyviridae*) (LE ROUX, 2005; WISLER et al., 1987) *watermelon mosaic virus* (WMV, *Potyvirus citrulli*, família *Potyviridae*), *bean common mosaic virus* (BCMV, *Potyvirus phaseoli*, família *Potyviridae*) (RICHARD et al., 2009), *bean yellow mosaic virus* (BYMV, *Potyvirus phaseoliteum*, família *Potyviridae*) (BHADRAMURTHY et al., 2011), *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV, *Potyvirus vignae*, família *Potyviridae*) (GRISONI et al., 2006), *Ornithogalum mosaic virus* (OrMV, *Potyvirus ornithogalitesellati*, família *Potyviridae*) (GRISONI et al., 2006) e *Wisteria vein mosaic virus* (WVMV, *Potyvirus wisteriae*, família *Potyviridae*) (GRISONI et al., 2006), *Vanilla virus X* (VVX, *Potexvirus ecsvanillae*, família *Alphaflexiviridae*) (GRISONI et al., 2017), *Vanilla latent virus* (VLV, *Allexivirus latensvanillae*, família *Alphaflexiviridae*) (GRISONI et al., 2017), *cucumber*

mosaic virus (CMV, *Cucumovirus CMV*, família *Bromoviridae*) (BESSE et al., 2009; FARREYROL et al., 2006; PEARSON et al., 1990; RICHARD et al., 2009; WANG; PEARSON, 1992), Rehmannia allexivirus (ReaV, família *Alphaflexiviridae*) (QIN et al., 2024) e Vanilla shenzhenica virus 1 (PÉREZ et al., 2025). Existe ainda um vírus denominado Vanilla distortion mosaic virus (acesso AY943945) com sequencia depositada em 2005 no banco de dados NCBI e cujo estudo não foi publicado, entretanto há registros do mesmo em outro hospedeiro (MEENA et al., 2022). Baunilhas infectadas podem apresentar sinais de infecção tais como manchas, mosaico e deformação foliar, distúrbios do crescimento e flores estéreis ou podem ser assintomáticas (RICHARD et al., 2009). Os problemas com viroses são maiores em locais com cultivo intensivo (BENEZET et al., 2000; MADHUBALA et al., 2005; RICHARD et al., 2009).

No Brasil ainda não se tem registros de vírus infectando baunilhas, entretanto alguns estudos apontam a ocorrência de vírus em espécies da família Orchidaceae (KITAJIMA et al., 1974; KLEIN, 2008; MAGALHÃES, 2024; MORAES et al., 2017).

Tabela 1: Vírus relatados infectando diferentes espécies de *Vanilla*.

Família – Gênero- Espécie	Nome do vírus (Acrônimo)	Espécie de <i>Vanilla</i>	Referência
<i>Alphaflexiviridae</i> - <i>Potexvirus</i> - <i>Potexvirus cymbidii</i>	Cymbidium mosaic virus (CymMV)	<i>V. tahitensis</i>	(WISLER et al., 1987)
<i>Alphaflexiviridae</i> - <i>Potexvirus</i> - <i>Potexvirus ecsvanillae</i>	Vanilla virus X (VVX)	<i>V. planifolia</i> , <i>V. pompona</i> *, <i>V. humblotii</i> *	(GRISONI et al., 2017)
<i>Alphaflexiviridae</i> – <i>Allexivirus</i> – <i>Allexivirus latensvanillae</i>	Vanilla latent virus (VLV)	<i>V. planifolia</i> , <i>V. pompona</i> *, <i>V. humblotii</i> *	(GRISONI et al., 2017)
<i>Virgaviridae</i> – <i>Tobamovirus</i> – <i>Tobamovirus odontoglossi</i>	Odontoglossum ringspot virus (ORSV)	<i>V. tahitensis</i>	(WISLER et al., 1987)
<i>Bromoviridae</i> – <i>Cucumovirus</i>	cucumber	<i>V. tahitensis</i>	(BESSE et al., 2009;

– <i>Cucumovirus CMV</i>	mosaic virus (CMV)		FARREYROL et al., 2006; PEARSON et al., 1990; RICHARD et al., 2009; WANG; PEARSON, 1992)
<i>Potyviridae – Potyvirus – Potyvirus dasheenii</i>	Vanilla mosaic virus (VanMV)	<i>V. planifolia</i>	(BHAT et al., 2004; RICHARD et al., 2009)
<i>Potyviridae – Potyvirus – Potyvirus dasheenii</i>	Dasheen mosaic virus (DsMV)	<i>V. tahitensis</i>	(LE ROUX, 2005; WISLER et al., 1987)
<i>Potyviridae – Potyvirus – Potyvirus citrulli</i>	Watermelon mosaic virus (WMV)	<i>V. tahitensis</i>	(RICHARD et al., 2009)
<i>Potyviridae – Potyvirus – Potyvirus phaseoli</i>	bean common mosaic virus (BCMV)	<i>V. tahitensis</i>	(RICHARD et al., 2009)
<i>Potyviridae – Potyvirus – Potyvirus phaseoliteum</i>	bean yellow mosaic virus (BYMV)	<i>V. planifolia</i>	(BHADRAMURTHY et al., 2011)
<i>Potyviridae – Potyvirus – Potyvirus vignae</i>	cowpea aphidborne mosaic virus (CABMV)	<i>V. planifolia</i>	(GRISONI et al., 2006)
<i>Potyviridae – Potyvirus – Potyvirus ornithogalitesellati</i>	Ornithogalum mosaic virus (OrMV)	<i>V. planifolia</i>	(GRISONI et al., 2006)
<i>Potyviridae – Potyvirus – Potyvirus wisteridae</i>	Wisteria vein mosaic virus	<i>V. tahitensis</i>	(GRISONI et al., 2006)

	(WVMV)		
<i>Betaflexiviridae - Tepovirus</i>	Vanilla shenzhenica virus 1 (VanShV1)	<i>V.</i> <i>shenzhenica</i>	(PÉREZ et al., 2025)

* detecção por ensaios de transmissão mecânica

4.2.1. *Potexvirus*

O gênero *Potexvirus* é um dos 7 gêneros da família *Alphaflexiviridae*. Os potexvirus apresentam partículas não envelopadas, filamentosas e flexuosas, com 470-1000 nm de extensão e 12-13 nm de diâmetro (Figura 2A). Seu genoma é composto de ssRNA (+) de 5.9-7 kb (Figura 2B). Infectam plantas e possuem afídeos como vetores (RAIGOND et al., 2020), bem como podem ser transmitidos mecanicamente. O gênero *Potexvirus* compreende 53 espécies. Dessas 53 espécies, CymMV (WISLER et al., 1987) e VVX (GRISONI et al., 2017) infectam espécies de *Vanilla*.

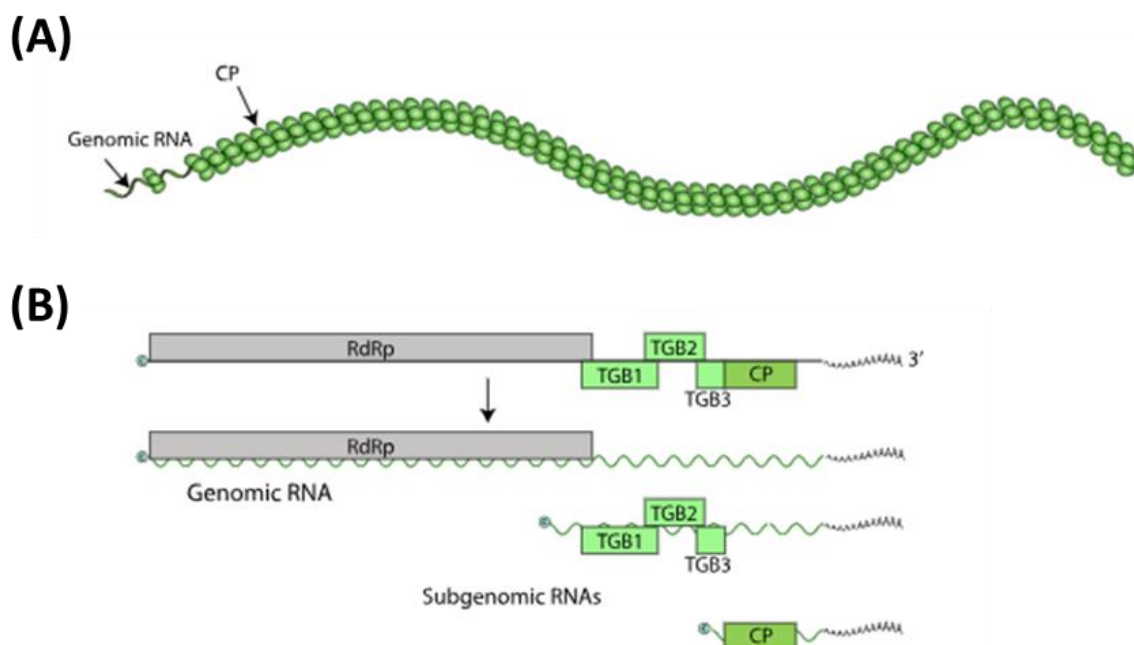


Figura 2: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) de vírus do gênero *Potexvirus*. RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), TGB1, 2 e 3 (Triple gene block 1, 2 e 3), CP (Capa proteica). Fonte: ViralZone.

4.2.2. *Allexivirus*

O gênero *Allexivirus* pertence à família *Alphaflexiviridae*, e seus membros possuem genoma de ssRNA (+) de ~9kb (Figura 3B), com partículas não envelopadas, flexuosas e filamentosas com 800 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro (Figura 3A) (QIN et al., 2024) e é composto por 14 espécies. O nome *Allexivirus*, é derivado do hospedeiro mais comum, o alho. “*All*” vem de *Allium* sp., seguido de “ex” para a fonética de “X”. Existem subgrupos dentro do gênero, com relação aos hospedeiros (QIN et al., 2024). Das quatorze espécies de *Allexivirus*, oito possuem como hospedeiros monocotiledôneas como o alho: shallot virus X (ShVX – *Allexivirus ecsascalonicum*), garlic virus A (GarV-A – *Allexivirus alphallii*), garlic virus B (GarV-B – *Allexivirus betallii*), garlic virus C (GarV-C – *Allexivirus chiallii*), garlic virus D (GarV-D – *Allexivirus deltallii*), garlic virus E (GarV-E – *Allexivirus epsalii*), garlic virus X (GarV-X – *Allexivirus ecsallii*), e garlic-mite filamentous virus (GarMbFV – *Allexivirus filumallii*). Os seis demais infectam uma variedade de plantas incluindo alfalfa virus S (AVS – *Allexivirus sigmamedicagonis*), Arachis pintoí virus (ApV – *Allexivirus pintoí*), Senna severe yellow mosaic virus (SSYMV – *Allexivirus sennae*), blackberry virus E (BVE – *Allexivirus epsilon rubi*), Rehmannia allexivirus (ReaV – *Allexivirus rehmanniae*) (QIN et al., 2024) e Vanilla latent virus (VLV – *Allexivirus latensvanillae*) (GRISONI et al., 2017). Algumas espécies deste gênero (como GarV-B, GarV-C, GarV-D, e GarV-X) são transmitidas pelo ácaro *Aceria tulipae*, e todas através de transmissão mecânica (DĄBROWSKA et al., 2020).

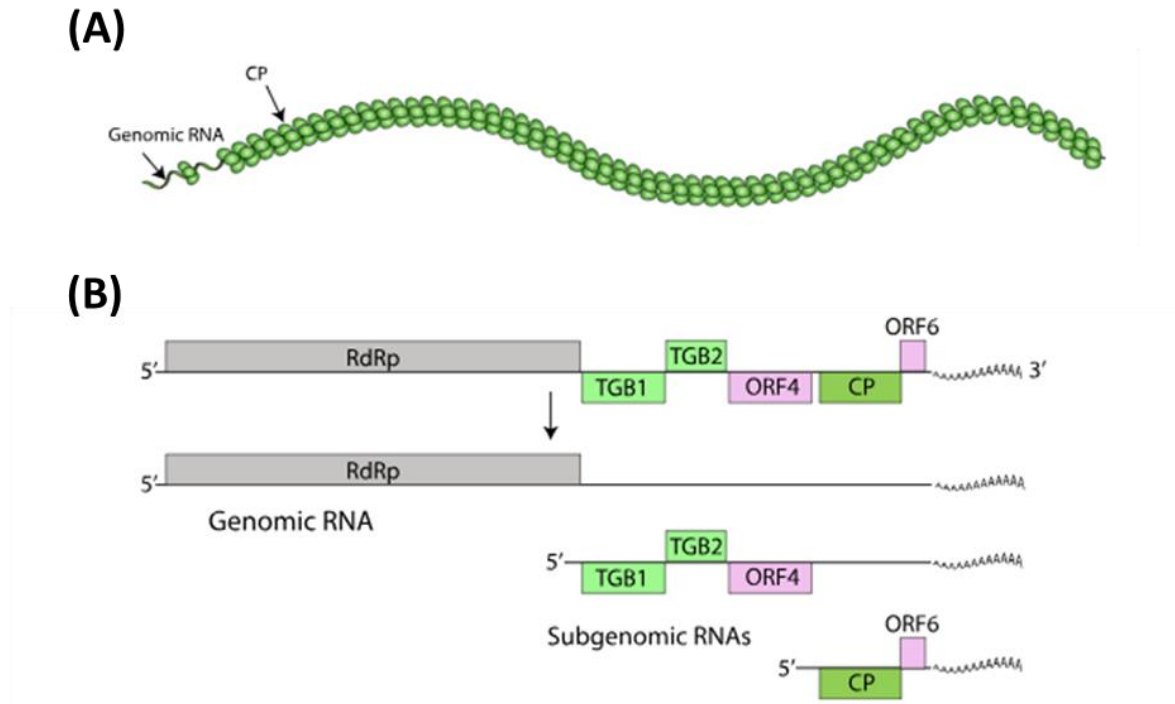


Figura 3: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) vírus do gênero *Alexivirus*. RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), TGB1 e 2 (Triple gene block 1 e 2), CP (Capa proteica) ORF4 e ORF6 (open reading frame). Fonte: ViralZone.

4.2.3. *Tobamovirus*

O gênero *Tobamovirus* (Família *Virgaviridae*) possui vírus com genoma de RNA de fita simples senso positivo, monopartido, linear com tamanho variando entre 6,3kb - 6,5kb (Figura 4B). Os *Tobamovirus* não são envelopados, e possuem partículas rígidas com simetria helicoidal (Figura 4A), com cerca de 18 nm de diâmetro e 300-310 nm de comprimento. Este gênero possui 37 espécies. A transmissão destes vírus ocorre de forma mecânica e seus hospedeiros são as plantas. Dentre as 37 espécies já descritas, o ORSV (WISLER et al., 1987) infecta baunilha e foi o primeiro vírus relatado em baunilha causando sintomas de lesões necróticas nas folhas.

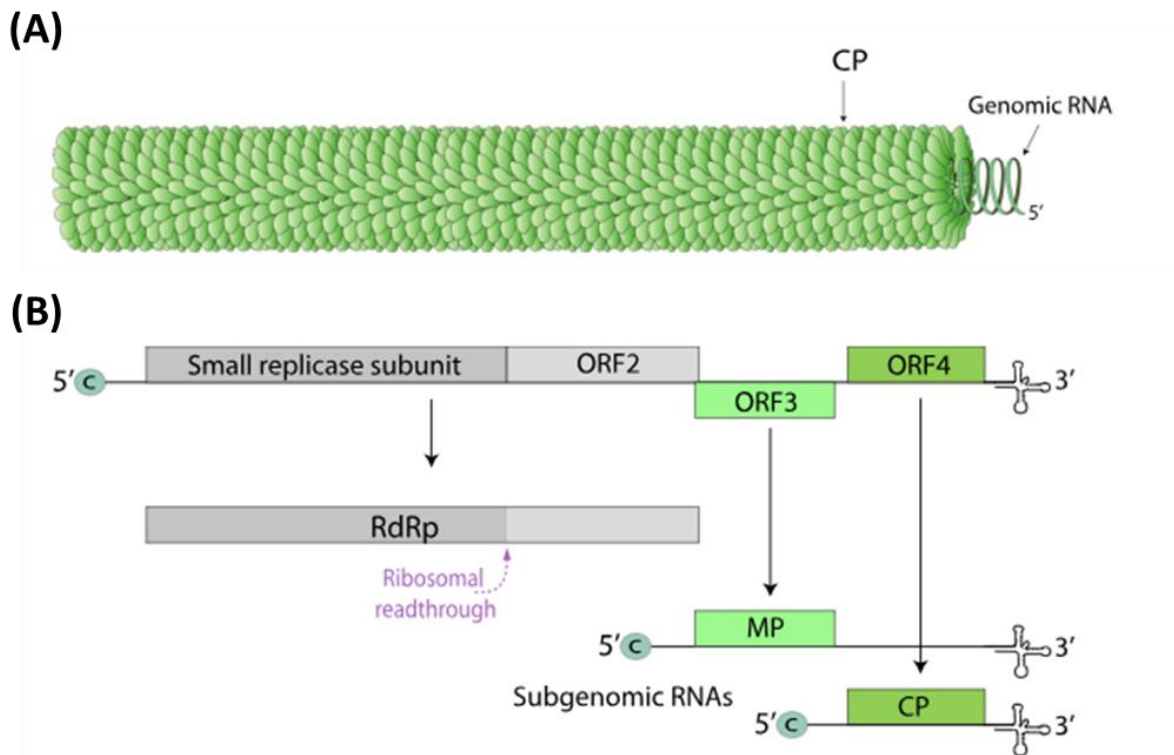


Figura 4: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) vírus do gênero *Tobamovirus*. Small replicase subunit, ORF 2, 3 e 4. RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) 1; RNAs subgenômicos com MP (proteína de movimento) e CP (Capa proteica). Fonte: ViralZone.

4.2.4. *Cucumovirus*

O gênero *Cucumovirus* (Família *Bromoviridae*) apresenta vírus de RNA fita simples senso positivo, com genoma tripartido composto por RNA1 (3,4 kb), RNA2 (3,1kb) e RNA3 (2,2kb) (Figura 5B) (RICHARD et al., 2009). As partículas virais não são envelopadas, apresentando vírions isométricos com cerca de 29nm de diâmetro (Figura 5A). Este gênero possui apenas 4 espécies descritas na literatura. A transmissão destes vírus ocorre de forma mecânica e por afídeos (RICHARD et al., 2009). Dentre as 4 espécies já descritas, temos uma espécie com ocorrência já relatada em baunilha, o CMV (BESSE et al., 2009; FARREYROL et al., 2006; PEARSON et al., 1990; RICHARD et al., 2009; WANG; PEARSON, 1992), que induz como principais sintomas mosaico e deformações. Pode também induzir perturbações graves de crescimento, floração e esterilidade, tendo um alto impacto na produção (RICHARD et al., 2009).

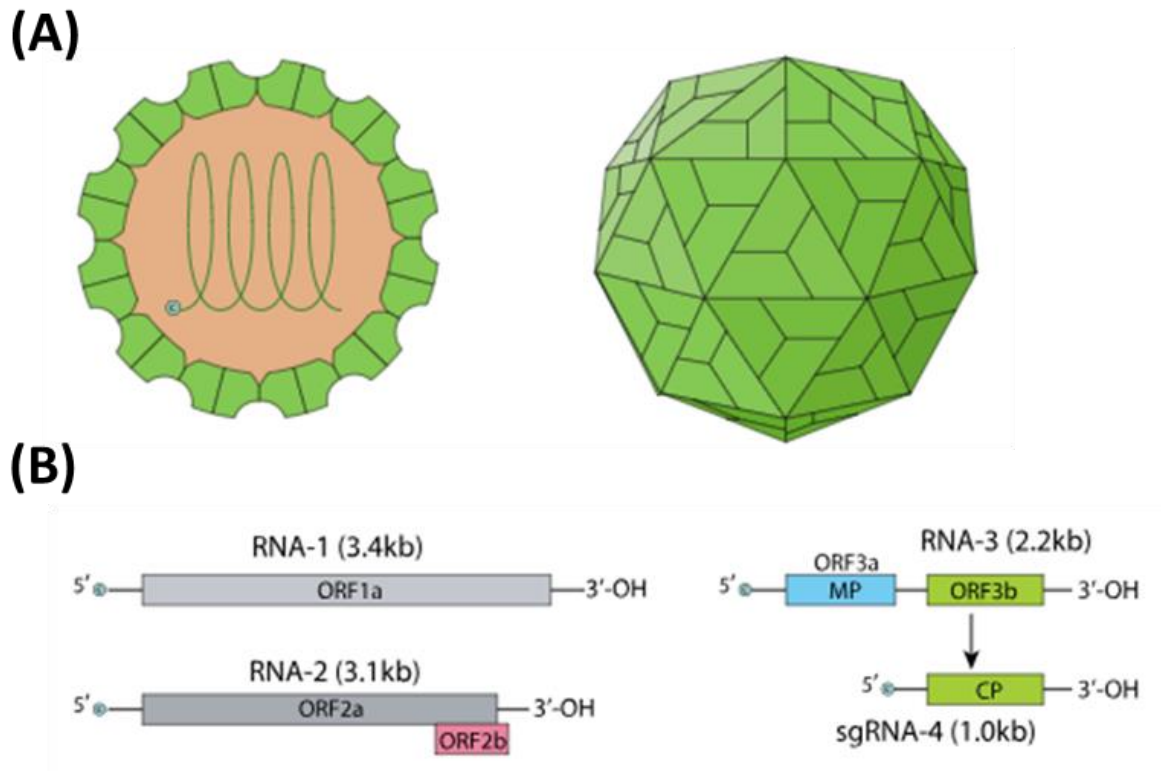


Figura 5: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) vírus do gênero *Cucumovirus*. RNA-1 com ORF1a; RNA-2 com ORF2a e ORF2b; RNA-3 com ORF3a codificando para MP (Proteína de movimento) e ORF3b codificando para sgRNA-4 com CP (Capa proteica). Fonte: ViralZone.

4.2.5. *Potyvirus*

O gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*) tem vírus com genoma de RNA fita simples senso positivo com cerca de 10kb (Figura 6B) (RICHARD et al., 2009). Suas partículas são flexuosas e filamentosas com 720-850nm de comprimento e 12-15nm de diâmetro e não envelopadas, (Figura 6A) (RICHARD et al., 2009). Este gênero possui 236 espécies já descritas, sendo que 8 espécies já foram tem membros infectando baunilha incluindo VanMV (BHAT et al., 2004; RICHARD et al., 2009); DsMV (LE ROUX, 2005; WISLER et al., 1987); WMV e BCMV (RICHARD et al., 2009); BYMV (BHADRAMURTHY et al., 2011); CABMV, OrMV e WVMV (GRISONI et al., 2006). Os potyvirus possuem como hospedeiros plantas de diferentes espécies, podendo ser transmitidos mecanicamente como também através de afídeos vetores pertencentes a superfamília *Aphidoidea*.

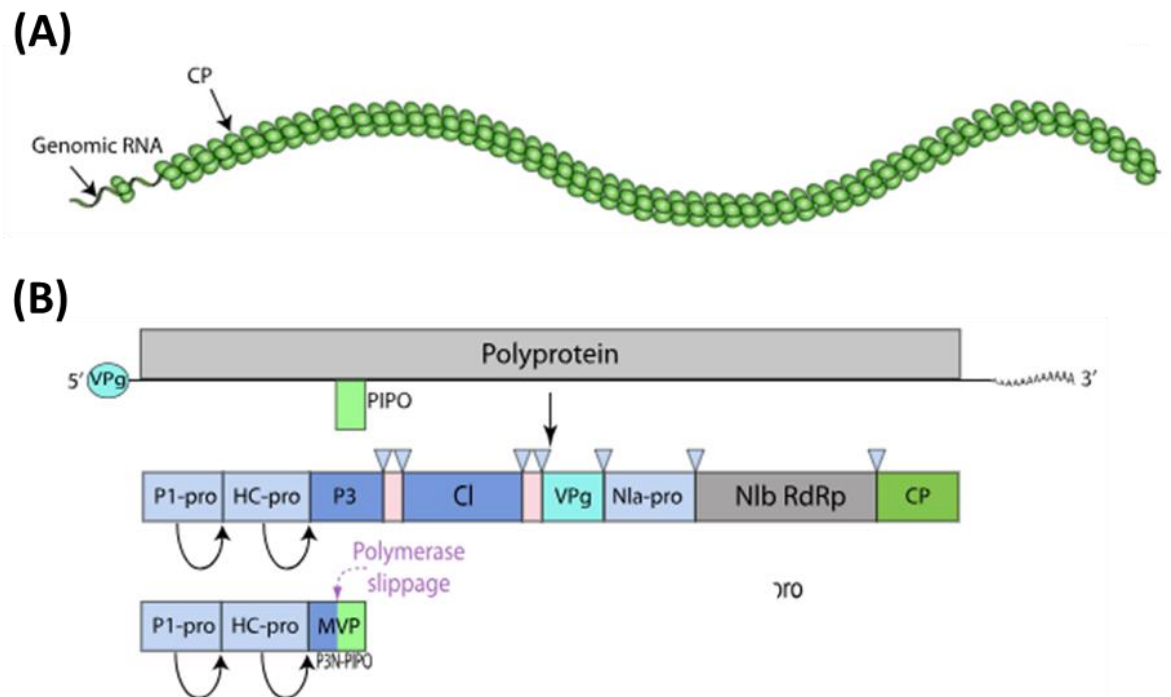


Figura 6: Estrutura da partícula (A) e do genoma (B) vírus do gênero *Potyvirus*. Poliproteína codificando para P1-pro (Proteína 1 Protease), HC-pro (Helper component-protease), P3 (Proteína 3), CI (Cylindrical inclusion protein), VPg (viral protein genome-linked), NIa-pro (nuclear inclusion a-protease), NIb-RdRp (inclusão nuclear b - RNA polimerase dependente de RNA), CP (capa proteica) e P3N-PIPO (Pretty interesting *Potyviridae* ORF), M (proteína de movimento M). Fonte: ViralZone.

5. METODOLOGIA

Todos os experimentos e análises foram realizadas no laboratório de Interação Planta-Praga III (LPP3) e Laboratório de Genética Vegetal, ambos localizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em Brasília – Distrito Federal (DF).

5.1. Coleta de amostras

Em 2022 o grupo da Dr. Marília Pappas fez coletas de amostras de folhas de acessos do BAG Baunilha ($n=33$, código 2734 – 2663).

Em 2023 foram coletadas amostras ($n=6$, código 2661 – 2666) de folhas de acessos da espécie *V. planifolia*, mantidas no Banco Ativo de Germoplasma de Baunilhas da Embrapa -

BAG Baunilha, mantido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal e coleção particular (Figura 7). Outras coletas adicionais de baunilha no BAG Baunilha (Figura 7) de todos os acessos das espécies *V.pompona*, *V. chamissonis*, *V. planifolia*, *V.columbiana* e *V.phaeantha*, da coleção de baunilhas da Embrapa Cerrados ($n= 12$, 3132 a 3143) foram realizadas entre 2023 a 2024.

Algumas plantas do BAG Baunilha já estavam sendo mantidas desde 2001 em telado. Ademais, tivemos a oportunidade de obter algumas amostras coletadas em 2024, de plantas recém-chegadas de expedições de coletas, sendo uma do Pará ($n=17$, 2670 a 2688) e outra da Bahia ($n=2$, 2667 e 2668). Essas plantas foram posteriormente plantadas no telado, onde as demais plantas são mantidas, e incluídas no BAG Baunilha.

Plantas matrizes de *Vanilla planifolia* ($n=7$, 2689 a 2695) e *Vanilla phaeantha* ($n=3$, 2696 a 2698) e mudas produzidas *in vitro* e cedidas pelo laboratório de genética vegetal - LGV também foram coletadas para indexação. As coletas destas plantas foram feitas em 2023.

Importante ressaltar, que todas as amostras coletadas de folhas de baunilhas não apresentavam nenhum sintoma típico de infecção viral.

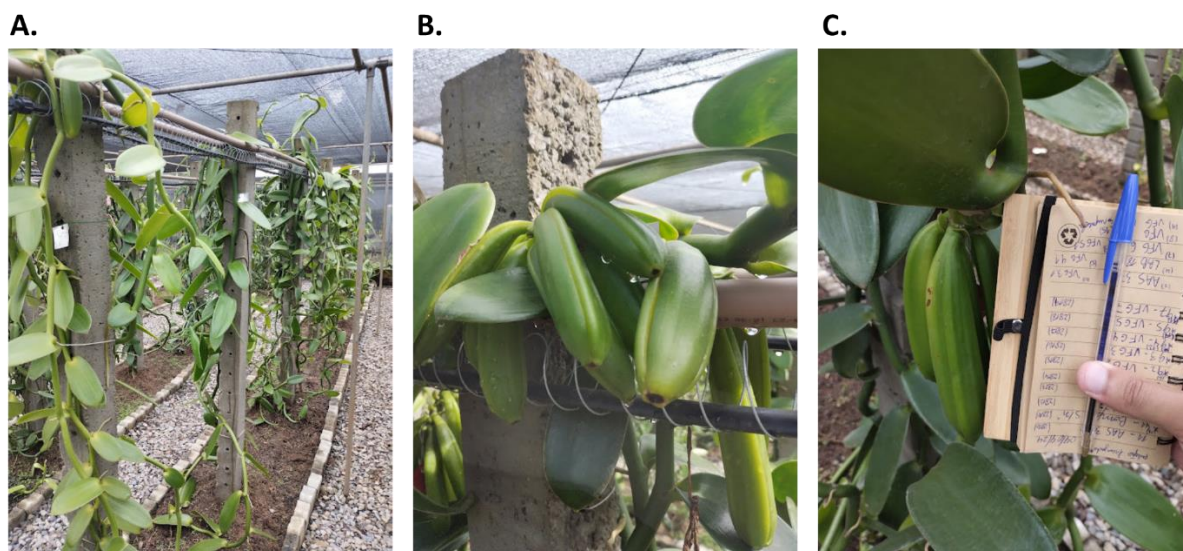


Figura 7: Plantas mantidas no BAG Baunilha da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (A) Cultivo de diferentes espécies de baunilha sob tela de sombreamento com suportes inertes e canteiros com matéria orgânica e sistema de irrigação automático. (B) e (C) Vagem (ou fava) de *Vanilla pompona*.

A tabela 2 apresenta a descrição das espécies de baunilhas coletadas por localidade.

Tabela 2: Amostras de espécies de *Vanilla* coletadas neste estudo e descrição de origem e ano de coleta.

Código	Espécie	Origem da Amostra/Expedição de Coleta	Origem UF/País	Ano de Coleta
2661	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha	BA/BR	2023
2662	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha	BA/BR	2023
2663	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha	BA/BR	2023
2664	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha	BA/BR	2023
2665	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha	TO/BR	2023
2666	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha	RJ/BR	2023
2667	<i>Vanilla cribbiana</i>	Coleção particular	BA/BR	2023
2668	<i>Vanilla cribbiana</i>	Coleção particular	BA/BR	2023
2670	<i>Vanilla cf*. trigonocarpa</i>	Pará	PA/BR	2024
2671	<i>Vanilla cf*. cribbiana</i> Soto	Pará	PA/BR	2024
2673	<i>Vanilla cf*. cribbiana</i> Soto	Pará	PA/BR	2024
2674	<i>Vanilla sp</i>	Pará	PA/BR	2024
2675	<i>Vanilla labellopapillata</i>	Pará	PA/BR	2024
2676	<i>Vanilla cf*. odorata</i>	Pará	PA/BR	2024
2677	<i>Vanilla sp.</i>	Pará	PA/BR	2024
2678	<i>Vanilla cf*. odorata</i> C.Pvresl	Pará	PA/BR	2024
2679	<i>Vanilla sp</i>	Pará	PA/BR	2024
2680	<i>Vanilla cf*. karen-christianae</i>	Pará	PA/BR	2024
2681	<i>Vanilla pompona</i>	Pará	PA/BR	2024
2682	<i>Vanilla cf*. phaeantha</i>	Pará	PA/BR	2024
2684	<i>Vanilla sp</i>	Pará	PA/BR	2024
2685	<i>Vanilla sp</i>	Pará	PA/BR	2024
2686	<i>Vanilla cf*. hartii</i>	Pará	PA/BR	2024
2687	<i>Vanilla ribeiroi</i>	Pará	PA/BR	2024
2688	<i>Vanilla sp</i>	Pará	PA/BR	2024
2689	<i>Vanilla planifolia (in vitro)</i>	Matrizes	Costa Rica	2023
2690	<i>Vanilla planifolia (in vitro)</i>	Matrizes	Costa Rica	2023
2691	<i>Vanilla planifolia (in vitro)</i>	Matrizes	Costa Rica	2023
2692	<i>Vanilla planifolia (in vitro)</i>	Matrizes	Costa Rica	2023
2693	<i>Vanilla planifolia (in vitro)</i>	Matrizes	Costa Rica	2023
2694	<i>Vanilla planifolia (in vitro)</i>	Matrizes	Costa Rica	2023
2695	<i>Vanilla planifolia (in vitro)</i>	Matrizes	Costa Rica	2023

2696	<i>Vanilla phaeantha (in vitro)</i>	Matrizes (BAG Baunilha)	MG/BR	2023
2697	<i>Vanilla phaeantha (in vitro)</i>	Matrizes (BAG Baunilha)	DF/BR	2023
2698	<i>Vanilla phaeantha (in vitro)</i>	Matrizes (BAG Baunilha)	GO/BR	2023
3132	<i>Vanilla planifolia (variegata)</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3133	<i>Vanilla appendiculata</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3134	<i>Vanilla pompona</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3135	<i>Vanilla pompona</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3136	<i>Vanilla pompona</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3137	<i>Vanilla pompona</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3138	<i>Vanilla planifolia</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3139	<i>Vanilla sp.</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3140	<i>Vanilla sp.</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3141	<i>Vanilla sp.</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3142	<i>Vanilla sp.</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
3143	<i>Vanilla sp.</i>	Embrapa Cerrados	Desconhe cido	2024
2734	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2735	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	DF/BR	2022
2736	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	RO/BR	2022
2738	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2739	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	RO/BR	2022
2740	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	AM/BR	2022
2748	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2750	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	DF/BR	2022
2756	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2759	<i>Vanilla pompona</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
3382	<i>Vanilla chamissonis</i>	BAG Baunilha (LGV)	MT/BR	2022
2783	<i>Vanilla bahiana</i>	BAG Baunilha (LGV)	MG/BR	2022
2784	<i>Vanilla bahiana</i>	BAG Baunilha (LGV)	DF/BR	2022
Telado 3 (P3)	<i>Vanilla bahiana</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2789	<i>Vanilla bahiana</i>	BAG Baunilha (LGV)	Desconhe cido	2022
Simon Lau 19/05/21	<i>Vanilla bahiana</i>	BAG Baunilha (LGV)	BA/BR	2022
2790	<i>Vanilla bahiana</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022

3386	<i>Vanilla chamissonis</i>	BAG Baunilha (LGV)	DF/BR	2022
ZGM		BAG Baunilha (LGV)	DF/BR	2022
29/08/21	<i>Vanilla chamissonis</i>			
3381	<i>Vanilla chamissonis</i>	BAG Baunilha (LGV)	DF/BR	2022
3380	<i>Vanilla chamissonis</i>	BAG Baunilha (LGV)	MS/BR	2022
2812	<i>Vanilla chamissonis</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
Bomfim s/n°	<i>Vanilla calyculata</i>	BAG Baunilha (LGV)	BA/BR	2022
VFG 2		BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
Valdeci	<i>Vanilla calyculata</i>			
2815	<i>Vanilla calyculata</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2816	<i>Vanilla calyculata</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2817	<i>Vanilla calyculata</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2818	<i>Vanilla calyculata</i>	BAG Baunilha (LGV)	GO/BR	2022
2819	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha (LGV)	RJ/BR	2022
2665	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha (LGV)	TO/BR	2022
2661	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha (LGV)	Desconhe cido	2022
2662	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha (LGV)	Desconhe cido	2022
2663	<i>Vanilla planifolia</i>	BAG Baunilha (LGV)	Desconhe cido	2022

5.2. Extração de RNA Total

As folhas de baunilha são fibrosas e espessas e foram maceradas em cadinhos com pistilos de cerâmica, e nitrogênio líquido. Em seguida, o macerado das amostras listadas na Tabela 2 foi usado para obtenção do RNA Total usando Trizol Reagent® (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração de RNA total, as amostras foram quantificadas e submetidas a eletroforese em gel de agarose à 0,9% corado com SybrSafe (Invitrogen®).

5.3. Sequenciamento HTS e análise de bioinformática

Neste trabalho, utilizamos os dados de um projeto coordenado pela Dra. Marília Pappas, do laboratório Genética Vegetal (LGV) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que visa a análise do transcriptoma de *Vanilla* spp. Pools de diferentes espécies de *Vanilla* (*V. chamissonis*, *V. phaeantha*, *V. planifolia*, *V. columbiana* e *V. pompona* coletadas no BAG Baunilha foram construídos e sequenciados por HTS pelo grupo da Dra. Marília. Cada pool compõe uma biblioteca sequenciada. Um total de 5 pools foram sequenciados e denominados

de Pool 1 ($n=5$, *V. chamissonis*), Pool 2 ($n=8$, *V. phaeantha*), Pool 3 ($n=4$, *V. planifolia*), Pool 4 ($n=6$, *V. columbiana*) e Pool 5 ($n=12$, *V. pompona*). As bibliotecas foram preparadas com o kit NEBNext UltraII RNA Library Prep e o sequenciamento HTS foi realizado em plataforma Novaseq 6000 com a estratégia PE150 na Novogene Corporation Inc., EUA.

Os dados brutos do sequenciamento nos foram cedidos e as análises foram feitas com objetivo de identificar vírus nessas plantas. Com auxílio de ferramentas de bioinformática, os reads pair-end foram tratados no programa *CLC Genomics* (QIAGEN®) (MATVIENKO; WORKBENCH, 2015), onde foram trimados e submetidos a *de novo assembly* para montagem dos contigs. No *de novo assembly*, um tamanho mínimo de 250 pb foi delimitado para montagem dos contigs.

A identificação preliminar dos vírus foi realizada no programa *Geneious® 10.2* (KEARSE et al., 2012) utilizando a ferramenta de pesquisa *BLAST* (*Basic local alignment search tool*) com as opções de Megablast para identificação de sequências de nucleotídeos e BLASTx para identificação de sequências de proteínas contra o banco de Genoma completo de vírus de nucleotídeos (RefSeq_plus Neighbor nucleotides)_e proteínas (RefSeq proteins) obtido do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) atualizados até 2023.

Para predição e anotação dos genomas virais foi utilizado o programa ORFfinder ([https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)) e ferramenta de anotação disponível no programa Geneious.

Outra estratégia utilizada para discriminação de variantes virais foi o mapeamento dos reads usando como referência os contigs virais obtidos com o *CLC Genomics* ou sequências provenientes do GenBank com auxílio da ferramenta *Map to reference* disponível no programa Geneious. Uma maior stringência do mapeamento entre os reads e as sequências referência foi designado, utilizando um default de *Custom sensitivity* combinado com um *minimum overlap identity* de 95%. As sequências obtidas tiveram seus genomas analisados.

5.4. Desenho de primers específicos

Pesquisas BLAST identificaram vários *contigs* com identidade com o *Allexivirus* Vanilla latent virus (VLV), com a ocorrência de duas possíveis variantes de VLV. Baseado nessas sequências foram desenhados primers específicos (Tabela 3) que amplificam o gene da CP (capa proteica) para confirmação da identidade e análise filogenética.

Para a variante VLV-BR1 foram utilizados 3 sets de primers: *Allexivirus_CP_F* e *Allexivirus_CP_R* que amplifica um fragmento de ~800pb que corresponde a CP completa,

Allexivirus-7248-CP-F e Allexivirus_CP_R que amplifica um fragmento de ~1200pb que corresponde a CP completa e a TGB3 parcial, e Allexivirus-7109-CP-F com Allexivirus_CP_R amplifica um fragmento de ~1200pb que corresponde a CP completa e a TGB3 parcial.

Para o VLV-BR2 foram projetados 2 sets de primers. VLV_CP_16F e VLV_CP_1405R que amplificam um fragmento de ~684pb que corresponde a CP parcial, faltando apenas três nucleotídeos no início e no final da CP. Um segundo set de primers, VLV_CP_848F e VLV_CP_1405R que amplifica um fragmento de ~557pb, correspondente a CP parcial. Além desses, utilizamos o set de primers VLV3F e VLV4R (GRISONI et al., 2017) que amplifica um fragmento de ~500pb que corresponde a CP parcial de VLV-CRV2148ALL (isolado de VLV das Ilhas Reunião).

Todas as sequências e condições para amplificação estão resumidas na Tabela 3. Para averiguar a qualidade do RNA foram realizadas reações de PCR com primers que amplificam o gene cloroplasmático *rbcl* (DE-BARROS LOPES, 2012).

Tabela 3: Primers utilizados neste estudo para confirmação da presença do VLV em amostras de *Vanilla* sp.

Primers (Referência)	Sequência (5'- 3')	Amplicon (gene)/ TM °C
VLV_CP_16F (Este estudo)	ACTAACATAGGAACTGGCTCAAG	(~684pb) gene CP parcial/60°C
VLV_CP_1405R (Este estudo)	CGAAGGTGATCATGGGTGGG	
VLV_CP_848F (Este estudo)	TAATGCCAACAATTGCGGCC	(~557pb) Gene CP parcial /60°C
VLV_CP_1405R (Este estudo)	CGAAGGTGATCATGGGTGGG	
VLV3F (GRISONI et al., 2017)	TTACCAGACGACGCCCTATC	(~500pb) Gene CP/60°C

VLV4R (GRISONI et al., 2017)	CTCGGGCGATGTTGTAACAG	
Allexivirus_CP_F (Este estudo)	CATCAACACTGCCCCGAGGTTTGT	(~800pb) Gene CP/60°C
Allexivirus_CP_R (Este estudo)	CGATTTGAATAACGCAGGCTCCAA	
Allexivirus-7248-CP-F (Este estudo)	ATTGCCAGTACACTTCCAAC	(~1200pb) Gene CP completa e TGB3 parcial /60°C
Allexivirus_CP_R (Este estudo)	CGATTTGAATAACGCAGGCTCCAA	
Allexivirus-7109-CP-F	GTCACCAGCACAYTTCCGGC	(~1200pb) Gene CP completa e TGB3 parcial /60°C
Allexivirus_CP_R (Este estudo)	CGATTTGAATAACGCAGGCTCCAA	
RBCL-F (DE-BARROS LOPES, 2012)	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAG C	(~500pb) Gene RbCl/60°C
RBCL-R (DE-BARROS LOPES, 2012)	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	

5.5. Validação do HTS e detecção de vírus por RT-PCR

Para a detecção dos vírus nas amostras foram conduzidos vários ensaios de RT-PCR. A validação inicial foi realizada nos RNAs dos pools sequenciados. Os RNAs extraídos dos pools foram quantificados em 1µg/8µl, e tratados com DNase usando a DNase Turbo (Ambion®) nas seguintes condições: 1µl enzima DNase, 1µl DNase TURBO Buffer e 8µl de RNA Total (1µg de RNA Total). Após incubação a 37°C por 1 hora, foi adicionado 1µl de EDTA (25mM) e as amostras foram mantidas a 65°C por 10 minutos. O RNA tratado foi usado na síntese do cDNA com primer oligodT, primers randômicos e a enzima M-MLV Reverse

Transcriptase, nas seguintes condições: 10µl de RNA Total (1µg), 0,5µl de primer randômico (50µM), 0,5µl oligodT (10µM), 1µl dNTP (10mM), 2 µl DTT (0,1M), 4µl 5X Buffer e 1µl M-MLV (Promega®), incubados a 37°C por 1 hora.

O cDNA foi usado como template nas reações de PCR utilizando primers específicos nas condições de TM constantes na Tabela 3 para detecção do VLV-BR1 e VLV-BR2.

Todas as PCRs foram conduzidas com o kit Go Taq G2 DNA Polymerase (Promega®). As temperaturas de anelamento estão descritas na Tabela 3. Fragmentos do tamanho esperado foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 0,9%, corados com SYBR® Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific). Os géis foram visualizados e fotografados em transiluminador (Dark Reader blue transilluminators – Clare Chemical Research) e fotodocumentador (BIO-RAD Universal Hood II). Os fragmentos correspondentes ao tamanho esperado foram cortados do gel e purificados com kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), de acordo com o protocolo do fabricante.

5.6. Sequenciamento Sanger

Os DNAs purificados foram clonados e enviados para sequenciamento onde foram sequenciados pelo método Sanger (Macrogen, Coréia do Sul) para a confirmação da identidade do vírus. Na clonagem, foi utilizado o vetor pJET1.2/Blunt. Os DNAs foram tratados com Blunting Enzyme do kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific) para clivar as extremidades de adenina adicionada pela enzima durante a reação de PCR. A reação foi realizada nas seguintes condições: 1,64µl 2x Reaction Buffer; 0,16µl DNA Blunting Enzyme; 1µl DNA; 0,2 µl água autoclavada (2x), incubados à 70°C por 5 minutos.

Na clonagem, foi utilizado o vetor pJET1.2/Blunt (2974 pb, Thermo Fisher Scientific) nas seguintes condições: 1µl pJET 1.2; 1µl T4 DNA Ligase; 3µl DNA tratado e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. 5µl do DNA recombinante foi usado na transformação por choque térmico usando células competentes de *E. coli* DH10B (50 µl). As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina 100mg/µl e incubadas à 37°C por ~ 16 horas. As colônias foram selecionadas e crescidas em meio LB líquido com ampicilina 100mg/µl, incubadas à 37°C sob agitação por ~ 16 horas.

Minipreparações foram feitas a fim de recuperar os clones recombinantes usando kit Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega).

Clones recombinantes positivos foram selecionados por digestão com enzima de restrição BglII (Promega) nas seguintes condições: 0,1µl da enzima BglII, 1,5µl Tampão 10x; 5µl de DNA plasmidial, e 8,4µl de água MiliQ, incubadas à 37°C por 2 horas e 65°C por 20 minutos.

As digestões foram visualizadas por eletroforese de gel de agarose à 0,9% corados com SYBR® SAFE DNA gel stain e fotografados no transiluminador BIO-RAD® (modelo Universal Hood II). Clones positivos foram sequenciados por sequenciamento de Sanger (Macrogen – Coréia do Sul) usando primers que anelam no vetor (pJET1.2 Forward Primer/pJET1.2 Reverse Primer).

As seqüências obtidas foram analisadas e montadas no programa *Geneious® 10.2* e identidades confirmadas por pesquisas BLASTn e BLASTx contra o banco de dados do NCBI.

5.7. Análise genômica e filogenética

Para comparação das seqüências obtidas nesse trabalho com a seqüências de outros *allexivirus*, foram realizadas comparação par-a-par de nucleotídeos e aminoácidos utilizando o programa SDT (Sequence Demarcation Tool Version 1.2 – SDTv1.2) (MUHIRE et al., 2014). Para a análise filogenética da CP foram utilizadas as seqüências obtidas através do sequenciamento Sanger de clones positivos que constam na Tabela 5. Foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando o programa MAFFT implementado no programa *Geneious® 10.2*, com os algoritmos padrões do software.

Para a confecção da árvore filogenética, foi feito alinhamento MUSCLE das seqüências de nucleotídeos obtidas neste trabalho com demais seqüências de *allexivirus*, para o genoma completo e gene da capa proteica, e proteína para o gene da capa proteica, conduzidos a uma história evolutiva de máxima verossimilhança baseado no modelo *General Time Reversible*. A árvore gerada com maior probabilidade de log foi utilizada e as análises evolutivas foram realizadas no programa iqtree 1.6.12-Windows.

Tabela 4: Acessos de seqüências de *Allexivirus* utilizados nas análises filogenéticas.

Acesso	Vírus
AB010300	Garlic virus A
KM379144	Garlic virus B
AB010302	Garlic virus C
KF555653	Garlic virus D
U89243	Garlic virus X
M97264	Shallot virus X

AJ292230	Garlic virus E
JN053266	Blackberry virus E
X98991	Garlic mite-borne filamentous virus
MF150239	Vanilla latent virus
KX058345	Arachis pintoï virus
PP097219	Rehmannia allexivirus
MN031278	Senna severe yellow mosaic virus
KY696659	Allexivirus sigmamedicagonis
JX682826	Allexivirus DS-2013/CZE
GU481094	Senna severe yellow mosaic virus
EU835196	Shallot mite-borne latent virus

Tabela 5: Sequências obtidas neste trabalho por sequenciamento Sanger de clones positivos.

Código	Hospedeira	Primers usados	Vírus
2661_16F01*	<i>V.planifolia</i>	VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R	VLV – BR2
2662_16F02*	<i>V.planifolia</i>	VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R	VLV – BR2
2666_16F04*	<i>V.planifolia</i>	VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R	VLV – BR2
2674_16F05*	<i>V.sp</i>	VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R	VLV – BR2
2674*	<i>V.sp</i>	VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R	VLV – BR2
2663_C5_7109**	<i>V.planifolia</i>	Allexivirus_7109_CP_F/ Alexivirus_CP_R	VLV – BR1
2689_C1_7109**	<i>V.planifolia</i>	Allexivirus_7109_CP_F/ Alexivirus_CP_R	VLV – BR1
2689_C2_7109**	<i>V.planifolia</i>	Allexivirus_7109_CP_F/ Alexivirus_CP_R	VLV – BR1
2689_C3_7109**	<i>V.planifolia</i>	Allexivirus_7109_CP_F/ Alexivirus_CP_R	VLV – BR1
2695_7248F_C4**	<i>V.planifolia</i>	Allexivirus_7248_CP_F/ Allexivirus_7248_CP_R	VLV – BR1
2695_7248F_C5**	<i>V.planifolia</i>	Allexivirus_7248_CP_F/ Allexivirus_7248_CP_R	VLV – BR1
2695_CPFR_C1**	<i>V.planifolia</i>	Alexivirus_CP_F/Alexivirus_CP_R	VLV-BR1
2662_CPFR_C1**	<i>V.planifolia</i>	Alexivirus_CP_F/Alexivirus_CP_R	VLV-BR1
2662_CPFR_C2**	<i>V.planifolia</i>	Alexivirus_CP_F/Alexivirus_CP_R	VLV-BR1
2689_CPFR_C1**	<i>V.planifolia</i>	Alexivirus_CP_F/Alexivirus_CP_R	VLV-BR1
2689_CPFR_C3**	<i>V.planifolia</i>	Alexivirus_CP_F/Alexivirus_CP_R	VLV-BR1
2690_CPFR_C1**	<i>V.planifolia</i>	Alexivirus_CP_F/Alexivirus_CP_R	VLV-BR1
2690_CPFR_C3**	<i>V.planifolia</i>	Alexivirus_CP_F/Alexivirus_CP_R	VLV-BR1
2695_CPFR_C3**	<i>V.planifolia</i>	Alexivirus_CP_F/Alexivirus_CP_R	VLV-BR1

*CP parcial; **CP completa.

5.8. Avaliação de matrizes cultivadas *in vitro*

O laboratório de conservação *in vitro* – LCIV, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tem desenvolvido protocolos de multiplicação clonal de espécies de baunilha para que seja implementado no futuro, uma metodologia eficiente de multiplicação *in vitro* de baunilhas brasileiras (MEDEIROS et al., 2024). Essas plantas têm sido geradas por multiplicação a partir de gemas laterais, cultivadas em meio MS, e mantidas em tubos de ensaio por ~3 meses (MEDEIROS et al., 2024).

No presente trabalho, foram utilizadas mudas de plantas matrizes mantidas *in vitro* de duas espécies (*Vanilla planifolia*, código 2689 a 2693, e *Vanilla phaeantha*, código 2694 a 2698) que foram cedidas pelo LCIV. As plantas mantidas em meio de cultura foram retiradas dos tubos, tiveram as folhas coletadas e armazenadas no freezer -80 °C até as análises.

Outros clones de *V. planifolia* (obtidos a partir da matriz 2689), mantidas *in vitro*, foram utilizadas para indexação e detecção de vírus. As diferentes mudas mantidas por 3 meses e crescidas *in vitro*, foram retiradas dos tubos de ensaio (Figura 8) e aclimatadas em copo plástico com substrato Bioplant Plus® e vermiculita na proporção (2:1). A aclimação foi realizada em câmara de crescimento com temperatura média de 25°C e fotoperíodo de 16h-8h (luz-escuro). A aclimação seguiu com as seguintes condições: 15 dias com as plantas de baunilha dentro de copo selado com outro copo invertido (Figura 9A); 7 dias seguintes com as plantas dentro do copo selado e com algumas aberturas no copo de cima (Figura 9B); os próximos 9 dias com as plantas de baunilha dentro do copo com abertura total no topo do copo de cima (Figura 9C). No trigésimo dia, o copo superior foi retirado e as baunilhas mantidas assim para posterior avaliação. Frequentemente as baunilhas podem não se adaptar muito bem, podendo resultar na morte da planta.



Figura 8: Mudanças de baunilhas propagadas in vitro antes de aclimatização.

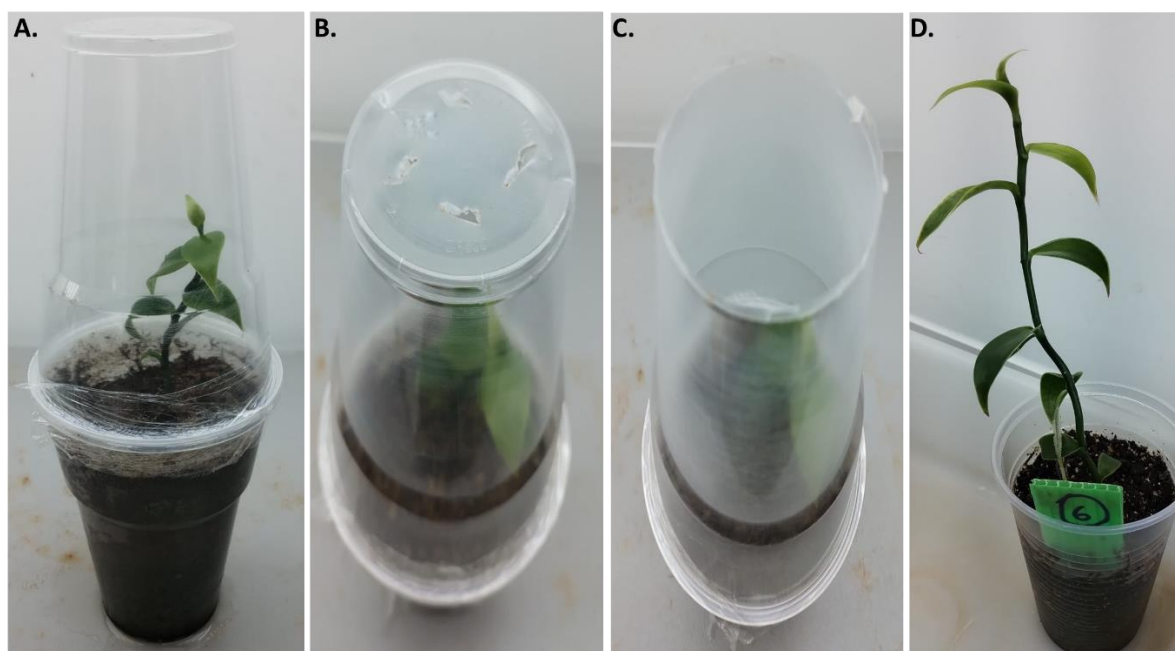


Figura 9: Aclimação de mudas de *Vanilla planifolia* cultivadas in vitro.

5.9. Caracterização biológica e ensaios de inoculação mecânica

Para caracterizar biologicamente as variantes VLV-BR1 e VLV-BR2 foram realizados ensaios de inoculação mecânica para verificar a infectividade e determinação de hospedeiros alternativos dos vírus estudados nessa pesquisa.

Para a inoculação mecânica foram selecionadas como fonte de inóculo plantas de *V. planifolia* positivas para VLV-BR1 (amostra 2663, BAG – Tabela 2) e *V. planifolia* positivas para VLV-BR2 (amostra 2666 e 2674, oriundas do BAG e Pará respectivamente – Tabela 2), confirmados previamente por RT-PCR.

O VLV-BR2-isolado 2666 foi inoculado em oito plantas sadias de *Nicotiana benthamiana*, enquanto o VLV-BR2-isolado 2674 foi inoculado em nove plantas de *N. benthamiana* ($n=8$ para a amostra 2666, e $n=9$ para a amostra 2674,). Enquanto o VLV-BR1-isolado 2663 foi inoculado em nove *N. benthamiana*.

Foram também utilizadas plantas sadias de *Chenopodium quinoa* ($n=6$ para a amostra 2666, e $n=7$ para a amostra 2674,) e *Chenopodium amaranticolor* ($n=3$ para a amostra 2666, e $n=3$ para a amostra 2674,).

Para a inoculação mecânica, foi coletado aproximadamente 1g de folhas, que foram maceradas utilizando cadinho e pistilo de cerâmica e nitrogênio líquido (Figura 10A). Ao macerado foram adicionados 5ml de tampão de inoculação (Tampão fosfato 0,1M pH 8; Na_2SO_2 0,01M; EDTA 0,0025M) (GRISONI et al., 2017) (Figura 10B). O extrato obtido foi espalhado com o dedo sobre a superfície das folhas das plantas sadias previamente pulverizadas com carborundum 600 mesh (Figura 10C). Em seguida, o excesso de extrato e carborundum foi retirado com água destilada utilizando uma pisseta. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento por até 30 dias.

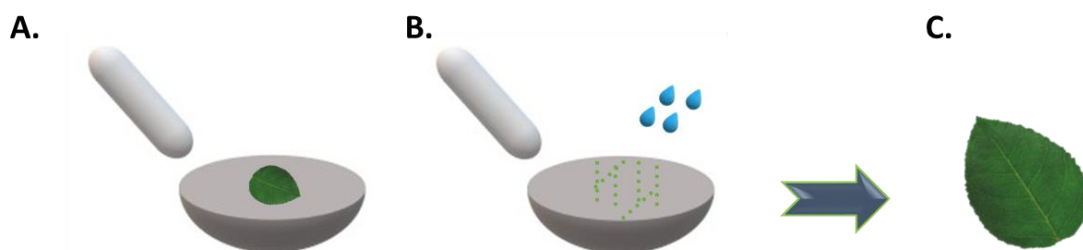


Figura 10: Processo de inoculação mecânica. (A) Maceração de folha (fonte de inóculo) com pistilo e cadinho de cerâmica e nitrogênio líquido. (B) Mistura de folha macerada com tampão de inoculação e (C) Aplicação de extrato sob a superfície das folhas de plantas sadias de diferentes espécies.

Quatorze e trinta dias após a inoculação, foram coletadas amostras de tecido foliar da terceira folha de cima para baixo da planta, e o RNA Total foi extraído com Trizol Reagente. Os RNAs foram submetidos a ensaios RT-PCR seguindo as mesmas condições da PCR descritas anteriormente.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Sequenciamento HTS e análise da biblioteca de *V. planifolia*

As análises do sequenciamento dos pools de *V. chamissonis*, *V. phaeantha*, e *V. pompona* não apresentaram identidade com nenhum vírus, o que pode estar atrelado com o preparo do material para o sequenciamento, uma vez que o kit utilizado enriquece o material com poli-A, logo vírus sem cauda poli-A não seriam detectados. A biblioteca de *V. columbiana* apresentou 3 contigs que podem representar um novo membro do gênero *Allexivirus*, entretanto não logramos em identificar e recuperar esse vírus de nenhuma das amostras individuais do pool. Desse modo, neste trabalho os esforços foram direcionados ao estudo do pool de *V. planifolia* e seus desdobramentos.

Na análise do sequenciamento da biblioteca do pool de *V. planifolia*, a montagem dos reads produziu 89.217 contigs. Nas análises de BLASTx e BLASTn contra o banco de vírus foram identificados 60 contigs apresentando maior identidade com o Vanilla latent virus (VLV, *Allexivirus latensvanillae*) isolado CRV2148ALL (GRISONI et al., 2017). Esses contigs apresentaram tamanhos variando entre 253 nt a 7248 nt. Dos contigs gerados, 68% nas análises de BLASTx e 60% nas análises de BLASTn, apresentou identidades acima de 90% com VLV-CRV2148ALL. Os 32% dos contigs restantes nas análises de BLASTx e 40% análises de BLASTn, tiveram identidades entre 55.07% e 89.82% com o VLV-CRV2148ALL. O atual critério de demarcação de espécies para o gênero *Allexivirus* baseia-se em diferenças menores que 72% de identidade de nucleotídeos, ou menores que 80% de identidade para aminoácidos para os genes da CP ou RdRp (ADAMS, 2025). Considerando que as identidades de mais de 90% dos contigs correspondentes à CP e à RdRp ($n=41$) apresentaram valores superiores a 72% e 80% para nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. Portanto, consideramos que as plantas de baunilha utilizadas no sequenciamento estão infectadas pelo VLV.

Existe apenas um registro de VLV na literatura, tendo sido identificado em plantas de *V. planifolia*, *V. pompona* e *V. humblotii*, nas ilhas Reunião em 2017 (GRISONI et al., 2017). No presente estudo, temos o segundo registro do VLV no mundo e o primeiro registro da ocorrência de VLV em espécies de *Vanilla* no Brasil.

Com base ainda na identidade de sequência dos contigs obtidos em relação ao VLV-CRV2148ALL, temos um grupo maioritário que é mais próximo ao VLV-CRV2148ALL e um segundo grupo com identidades de sequências menores, o que nos leva a supor que podem existir duas variantes do VLV infectando as plantas analisadas.

6.2. Predição genômica dos genomas de *Vanilla latent virus*, variantes VLV-BR1 e VLV-BR2

Para dar continuação ao trabalho e com base na hipótese de que teríamos duas variantes de VLV infectando as plantas de baunilha analisadas, procuramos contigs que pudessem representar o genoma completo (ou quase completo) dessas variantes. Um contig de 7248 nt (Contig_373) apresentando identidade de 76.81% com VLV-CRV2148ALL nas análises de BLASTn foi identificado na biblioteca de *V. planifolia*. Este contig foi denominado de VLV-BR1 e apresenta uma organização genômica típica para um membro do gênero *Allexivirus*, com genoma e anotação dos genes similares ao VLV-CRV2148ALL (Figura 11). VLV-BR1 apresenta um genoma contendo uma ORF1 (4371 nt/1439 aa) que codifica o gene RdRp, ORF2 (714 nt/238 aa) codificando para gene TGB1, ORF3 (309nt/103aa) que codifica para TGB2, ORF4 codificando para gene TGB3 (234nt/78aa), ORF5 (771nt/257aa) codificando para P40, e a ORF6 (714nt/238aa) que codifica para o gene da CP.

Dos contigs com identidade >90% em relação ao VLV-CRV2148ALL, nenhum apresentou-se como genoma completo. Para determinar a sequência completa (ou quase completa) de uma segunda variante mais próxima ao VLV-CRV2148ALL foi realizada uma montagem baseada em referência. Inicialmente foi feito um mapeamento dos *reads* usando como referência a sequência do VLV-BR1. Os *reads* foram mapeados usando o software Geneious. Foram considerados no mapeamento uma identidade de 100% dos *reads* com a sequência VLV-BR1. De 41.766.460 *pared-end reads*, 249.168 *reads* mapearam no VLV-BR1, e 41.517.293 *reads* não mapeadas foram filtrados e extraídos. Os *reads* extraídos (que não fazem parte da sequência do VLV-BR1) foram mapeados na sequência de referência do VLV (isolado VLV-CRV2148ALL) (MF150239) (GRISONI et al., 2017) considerando identidades acima de 95%. Ao final do mapeamento, 244,754 *reads* tiveram identidades >95% em relação a VLV-CRV2148ALL RefSeq MF150239. Uma sequência consenso de 7.462 nt foi obtida, com identidade de 95,3% com VLV-CRV2148ALL e denominada VLV-BR2.

VLV-BR2 (Figura 11) apresenta um genoma contendo uma ORF1 (4272nt/1424aa) codificando para gene da RdRp, ORF2 (714nt/238aa) codificando para gene TGB1, ORF3

(309nt/103aa) codificando para TGB2, ORF4 (234nt/78aa) codificando para TGB3, ORF5 (1077nt/359aa) codificando a P40, e a ORF6 (705nt/235aa) codificando para o gene da CP.

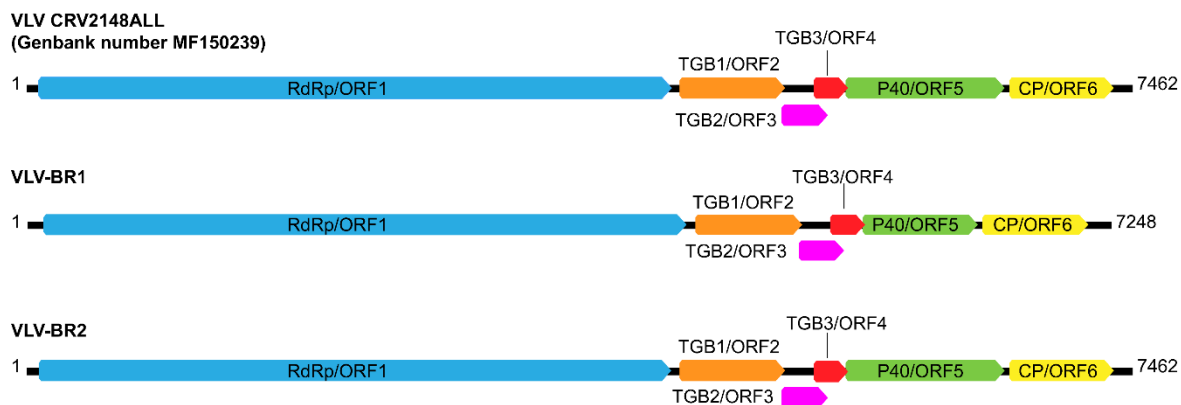


Figura 11: Organização genômica das variantes VLV-CRV2148ALL, VLV-BR1 e VLV-BR2. RdRp- RNA dependente de polimerase, TGB1 – Triple Gene Block 1 em, TGB2 – Triple Gene Block 2, TGB3 – Triple Gene Block 3, P40 e CP – Capa proteica.

A RdRp é uma proteína importante para o vírus, pois é por meio dela que ocorre o processo de replicação viral (VENKATARAMAN et al., 2018). As TGB's (Triple Gene Block) são fundamentais para o movimento do vírus dentro das células do hospedeiro atuando nos plasmodesmas da planta (KANG et al., 2007), auxiliando no movimento célula a célula e de longa distância (MOROZOV; SOLOVYEV, 2003). A P40, proteína característica de todos os *Allexivirus* e auxilia na replicação viral (MCGAVIN et al., 2024), e por último temos a CP, que possui função de encapsidar o RNA viral formando a partícula do vírus (KANYUKA et al., 1992).

Foi observado que o VLV-BR1, VLV-BR2 apresentam uma RdRp iniciada por um códon de iniciação alternativo “CTG” e não o códon de iniciação padrão “ATG”, similar a RdRp do VLV- CRV2148ALL. A utilização por codón de iniciação alternativo também é visto no gene para a TGB3 de vírus do gênero *Allexivirus*, como: GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X, BVE e ShVX (MANSOURI; RYŠÁNEK, 2021). Já a RdRp do VLV-BR2 inicia com o códon alternativo “CUG”, assim como a TGB3 do vírus BVE (Blueberry virus E) (SABANADZOVIC et al., 2011).

6.3. Detecção de VLV-BR1 e VLV-BR2 nas amostras de espécies de *Vanilla*

As folhas de espécies de *Vanilla* são fibrosas com uma grossa espessura e bastante aquosas, o que torna mais difícil a extração dos ácidos nucleicos. Essa dificuldade é refletida na qualidade e quantidade dos RNAs totais de folhas de *Vanilla* spp. obtidas em nossas extrações (Figura 12). Mesmo assim, foi possível utilizar o RNA extraído e obter amplicons para o gene RBCL, típico de plantas e usado para aferir a qualidade da síntese do cDNA, e para detecção do VLV-BR1 e VLV-BR2.

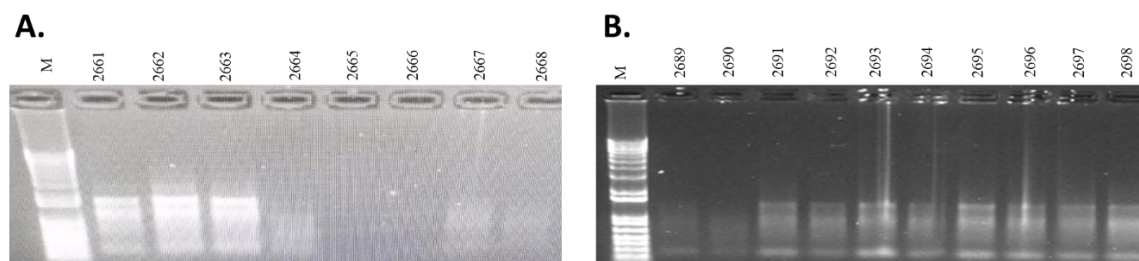


Figura 12: Eletroforeses em géis de agarose 0,9% de RNA Total amostras de baunilha. (A) RNA Total de amostras *Vanilla planifolia* (2661 a 2666) e *Vanilla cribbiana* (2667 e 2668). (B) RNA Total de amostras de *Vanilla planifolia* (2689 a 2693) e *Vanilla phaeantha* (2694 a 2698) M = Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco).

Para detecção das variantes de VLV, os primers (Tabela 3) foram testados inicialmente no RNA do pool de *V. planifolia* e demais pools sequenciados por HTS (Figura 13). Observamos um sinal positivo com um amplicon de tamanho esperado apenas para o pool de *V. planifolia* (Figura 13). Em decorrência da análise de bioinformática para os demais pools, foi revelado a ausência de vírus de genoma de RNA, logo o resultado negativo para presença das variantes de VLV, foi um resultado esperado em acordo com as análises de bioinformática anteriores. É importante ressaltar, que a confecção dos pools para o sequenciamento não possuía foco na detecção de vírus, o que possivelmente pode ter afetado em algumas análises.

Em decorrência dos resultados das reações, que demonstraram melhor amplificação, foram selecionados os sets de primers VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R para detecção de VLV-BR2 e Allexivirus_CP_F/Allexivirus_CP_R para a detecção de VLV-BR1.

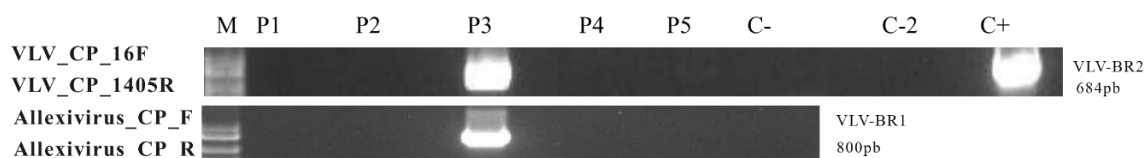


Figura 13: Eletroforeses de géis de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 (Allexivirus_CP_F/Allexivirus_CP_R) e VLV-BR2 (VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R) nos pools de RNA de *Vanilla*: P1 = Pool de *V. chamissonis*; P2 = Pool de *V. phaeantha*; P3 = Pool de *V. planifolia*; P4 = Pool de *V. columbiana*; P5 = Pool de *V. pompona*; M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle Negativo; C-2 = cDNA de Feijão; C+ = controle positivo.

Em seguida, os primers foram validados nas amostras de RNA individuais de plantas da espécie *V. planifolia* oriundas do BAG de Baunilhas da Embrapa (2661 a 2666) e coleções particulares que compunham o pool 3 (2667 e 2668) (Figuras 14 a 16).

RT-PCRs das amostras individuais 2661, 2662 e 2666 que compõe o pool de *V. planifolia*, tiveram resultado positivo com a utilização dos primers VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R que foram desenhados para amplificar um fragmento de 684 pb do VLV-BR2 (Figura 14). Foi utilizado para comparação na detecção do VLV-BR2, o set de primers VLV3F e VLV4R (GRISONI et al., 2017). Como resultado, foi possível observar que tanto o set de primers VLV3F e VLV4R quanto o VLV_CP_16F e VLV_CP_1405R amplificam fragmentos na mesma região que correspondem ao VLV-BR2, que possui alta identidade com o VLV-CRV2148ALL (Figura 14). Para este estudo, optamos por utilizar apenas o set VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R.

Utilizando os primers Allexivirus_CP_F/Allexivirus_CP_R que foram desenhados para amplificar um fragmento de ~800 pb de VLV-BR1, foram obtidos resultados positivos para as amostras 2662 e 2663 (Figura 14).

É importante destacar, que observamos infecção simples para VLV-BR2 nas amostras 2661 e 2666, e para VLV-BR1 na amostra 2663, e uma infecção mista das duas variantes na amostra 2662 (Figura 14). A ocorrência de variantes do mesmo vírus para um mesmo hospedeiro também pode ser observada em outros membros do gênero *Allexivirus* como o ReAV (QIN et al., 2024), como já foi apontado em outros estudos (GRISONI et al., 2017; MANSOURI; RYŠÁNEK, 2021).

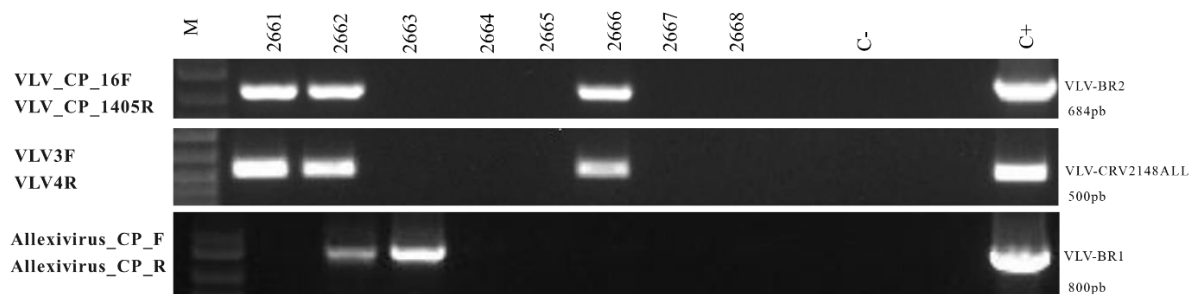


Figura 14: Eletroforeses de géis de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 e VLV-BR2 nas amostras do pool de *V. planifolia* e *V. cribbiana*. 2661 a 2666 = *V. planifolia*; 2667 e 2668 = *V. cribbiana*; M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle Negativo (cDNA de feijão); C + = Controle positivo.

Uma vez validados para a identificação específica de VLV-BR1 e VLV-BR2 em *V. planifolia*, que são plantas não nativas do Brasil, apesar de não termos por certo a origem das baunilhas analisadas nesse trabalho, nós utilizamos esses sets de primers para verificar se haveria a infecção de baunilhas brasileiras por essas variantes de VLV.

Primeiramente avaliamos um set de plantas que foram coletadas no estado do Pará em 2024. Essas plantas foram amostradas para o nosso trabalho antes mesmo de terem sido incluídas no BAG Baunilhas. Então, certamente no caso de serem positivas, essas plantas teriam sido infectadas no local de coleta no Pará. As amostras foram avaliadas para a presença de VLV-BR1 e VLV-BR2 utilizando os primers Allexivirus_CP_F/Allexivirus_CP_R e VLV_CP_16F/VLV_CP_1405R, respectivamente. Verificamos que as amostras 2674 (*Vanilla sp.*), 2676 (*Vanilla cf. odorata*) e 2686 (*Vanilla cf. hartii*) apresentaram resultado positivo para o VLV-BR2 (Figura 15), e nenhuma planta foi encontrada com o VLV-BR1 (Figura 15). Portanto pudemos constatar que o VLV, neste caso a variante VLV-BR2, está presente em ecossistemas naturais no Brasil. Há algumas iniciativas de cultivo de baunilha, *V. planifolia* oriunda do México, em Tomé Açú – PA, que datam do início dos anos 2000 (HOMMA et al., 2006). Alguns agricultores cultivavam *V. planifolia* em áreas de capoeira em plantio consorciado com seringueira, de onde o vírus pode ter se disseminado. Entretanto, as amostras positivas para VLV-BR2 foram coletadas em Belém (2674 e 2686) e Vila de Camotim (Abaetetuba) (2676) que ficam distantes mais de 100 km de Tomé Açú. Por mais que a baunilha seja cultivada através de propagação vegetativa (estaquia), é difícil hipotetizar a origem do VLV-BR2. No entanto, é importante observar a identificação de novos hospedeiros (*V. cf. odorata* e *V. cf. hartii*) para o VLV dentro do gênero *Vanilla* uma vez que até o momento VLV só havia

sido detectado infectando as espécies *V. planifolia*, *V. pompona* e *V. humblotii* nas Ilhas Reunião (GRISONI et al., 2017).

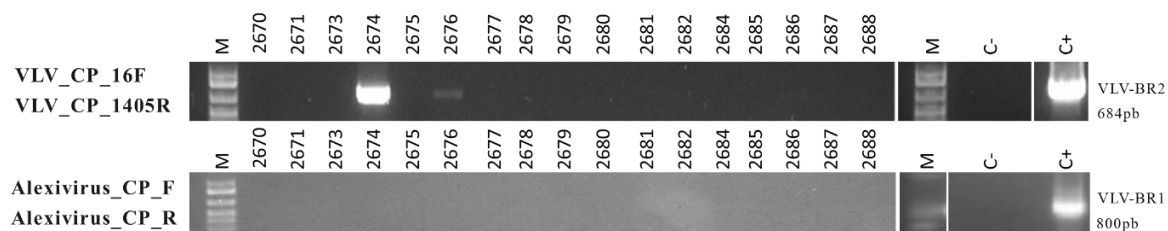


Figura 15: Eletroforeses de géis de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 e VLV-BR2 nas amostras do Pará. M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle negativo (Água); C + = Controle positivo (cDNA do pool de *V. planifolia*).

Tivemos a oportunidade de também avaliar plantas que fazem parte da coleção de baunilhas da Embrapa Cerrados. Doze amostras de *Vanilla* foram testadas para a presença de VLV-BR1 e VLV-BR2 (Figura 16). Neste caso, tivemos as amostras 3132 (*Vanilla planifolia*), 3142 e 3143 (*Vanilla sp.*) positivas para VLV-BR2. Na detecção para VLV-BR1 nenhuma das amostras foi positiva.

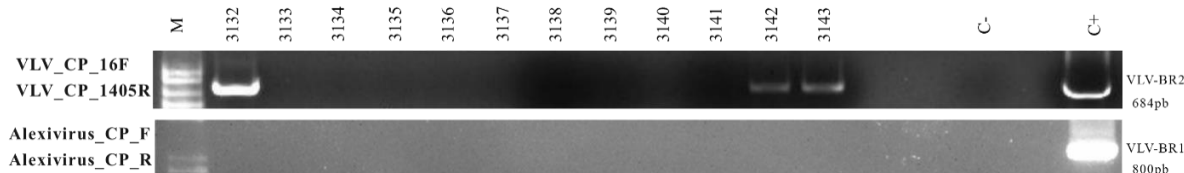


Figura 16: Eletroforeses de géis de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 e VLV-BR2 nas amostras de coleções biológicas da Embrapa Cerrados de diferentes espécies de *Vanilla*. M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle negativo (Água); C + = Controle positivo (cDNA do pool de *V. planifolia*).

Uma das ações do projeto “Desenvolvimento da cadeia produtiva de baunilhas brasileiras de importância para a gastronomia e agroindústria” é o desenvolvimento das metodologias eficientes de multiplicação *in vitro* de baunilhas. Como contribuição para essa iniciativa, no nosso estudo, nós testamos os primers desenhados para a diagnose de VLV-BR1 e VLV-BR2 e avaliamos matrizes e mudas clonais, com a finalidade de observar a propagação do vírus em diferentes gerações. Essas matrizes foram cultivadas pelo grupo de pesquisa do

laboratório de conservação *in vitro* – LCIV situado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e gentilmente cedidas para esse trabalho.

Foram testadas matrizes e mudas clonais de *V. planifolia* e matrizes de *V. phaeantha*. As matrizes de *V. planifolia* (amostras 2689, 2690, 2691 e 2695) e *V. phaeantha* (amostras 2696 e 2698) foram positivas apenas para o VLV-BR1 (Figura 17). Esse resultado indica que algumas das matrizes que estão sendo utilizadas para multiplicação clonal de mudas estão infectadas por VLV-BR1 e que possivelmente as mudas clonais obtidas a partir dessas matrizes também estariam infectadas.

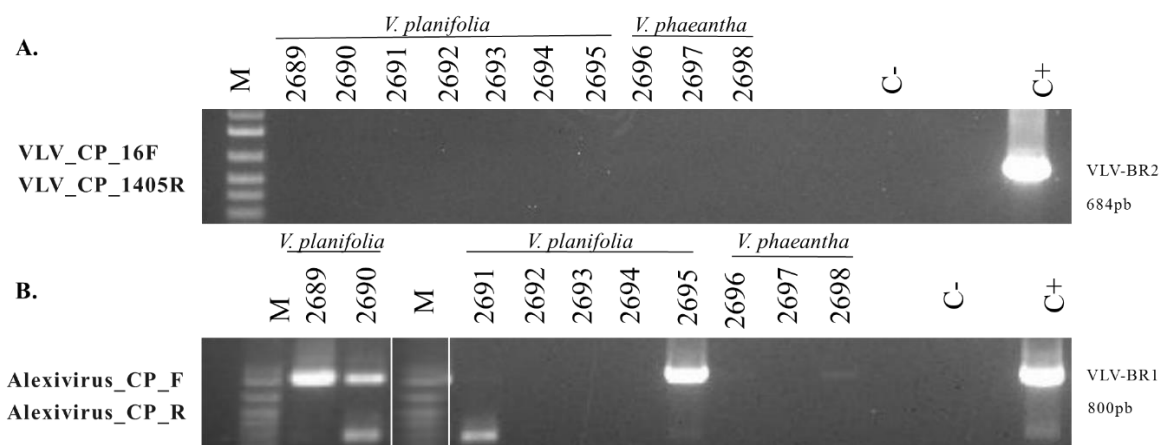


Figura 17: Eletroforese de gel de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 em matrizes das espécies *Vanilla planifolia* e *Vanilla phaeantha* cultivadas *in vitro*. (A) RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR2. (B) RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1. M= Marcador 1Kb DNA Ladder (Cellco); C - = Controle negativo (Água); C + = Controle positivo (cDNA do pool de *V. planifolia*).

Essa suposição se mostrou verdadeira já que houve a detecção do VLV-BR1 em todas as mudas clonais obtidas a partir da matriz *V. planifolia* 2689 testadas neste experimento (Figura 18). Nossos resultados demonstram um uso potencial dos primers desenvolvidos nesse trabalho para a indexação de matrizes e mudas para o VLV-BR1 e VLV-BR2. Além disso, podemos apontar que o método utilizado de multiplicação a partir de gemas laterais para a propagação dessas mudas clonais permite a propagação do VLV e potencialmente de outros vírus que estejam presentes em uma matriz. Logo, é de suma importância a detecção de vírus antes de sua multiplicação por meio de propagação vegetativa.

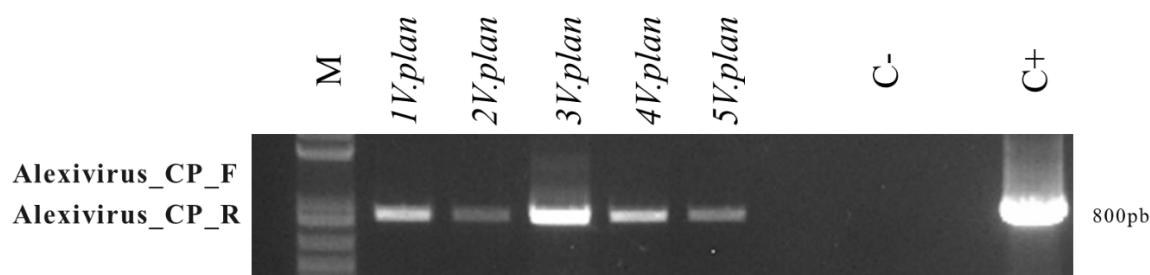


Figura 18: Eletroforese de gel de agarose a 0,9% das reações de RT-PCR com primers específicos para detecção do VLV-BR1 nas mudas clonais da obtidas da matriz *Vanilla planifolia* 2689.

As matrizes testadas de *V. planifolia* tem origem da Costa Rica enquanto as matrizes de *V. phaeantha* são provenientes do BAG-Baunilha. Isso indica que a variante VLV-BR1 está presente tanto na Costa Rica como no Brasil, já que as plantas matrizes de *V. phaeantha* foram coletadas em Goiás e Minas Gerais. Há ainda a possibilidade de outros acessos de *Vanilla* do BAG estarem também infectados pelo VLV-BR1.

6.4. Caracterização e filogenia das variantes VLV-BR1 e VLV-BR2

O atual critério de demarcação de espécies para o gênero *Allexivirus* para a proposição de novas espécies baseia-se em diferenças menores que 72% de identidade de nucleotídeos, ou menores que 80% de identidade para aminoácidos para o gene da CP ou RdRp (ADAMS, 2025).

Análises das identidades utilizando o alinhamento MAFFT no programa SDT comparando VLV-BR1 e VLV-BR2 e sequências obtidas de isolados deste trabalho, com a sequência referência do VLV-CRV2148ALL (MF150239), e de membros do gênero *Allexivirus* (Figura 19), reforçam as observações de que temos variantes de VLV infectando baunilhas no Brasil.

As comparações feitas par a par para análise das identidades utilizando o programa SDT do genoma completo de VLV-BR1 com os demais *Allexivirus* tiveram identidades que variam entre 58,2% a 74,1% para nucleotídeo. Contudo suas maiores identidades foram mesmo com o próprio VLV-CRV2148ALL (MF150239) (Figura 19).

O VLV-BR1 mostrou ser um pouco mais divergente que o VLV-BR2 em relação ao VLV-CRV2148ALL. Percentuais de identidades de nucleotídeos foram de 74,1% para o genoma completo quando comparados par a par entre o VLV-BR1 e o VLV-CRV2148ALL e

de 74% entre VLVBR1 e VLV-BR2 (Figura 19). O percentual de identidade de nucleotídeos para o genoma completo entre o VLV-BR2 e o VLV-CRV2148ALL foi de 95,3% (Figura 19).

Full genome (nt)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100					
VLV-BR1	74.1	100				
VLV-BR2	95.3	74.0	100			
JN053266_Blackberry_virus_E	60.1	60.3	60.3	100		
KX058345_Arachis_pintoi_virus	59.7	60.2	60.8	62.2	100	
MN031278_Senna_severe_yellow_mosaic_virus	60.6	60.0	60.4	59.8	61.2	100
KY696659_Allexivirus_sigmamedicagonis	59.8	60.0	60.2	59.9	61.3	60.9 100
PP097219_Rehmanna_allexivirus	58.3	58.2	59.3	60.2	60.5	58.9 60.0 100
AB010300_Garlic_virus_A	59.8	59.8	59.7	59.0	59.8	58.2 57.5 59.6 100
KF555653_Garlic_virus_D	58.9	58.5	59.2	59.3	59.1	57.5 58.5 58.8 65.1 100
AJ292230_Garlic_virus_E	59.3	59.3	58.9	58.8	59.2	58.0 58.0 59.4 65.3 71.0 100
M97264_Shallot_virus_X	59.7	59.9	59.7	59.2	60.2	58.1 58.0 59.3 65.2 63.7 63.3 100
KM379144_Garlic_virus_B	59.3	58.9	59.8	58.5	59.7	58.4 57.7 59.9 61.2 64.6 64.7 62.0 100
U89243_Garlic_virus_X	60.1	59.0	59.8	58.5	58.8	58.9 57.1 59.0 61.8 63.8 64.7 61.9 72.0 100
AB010302_Garlic virus C	58.6	58.8	58.5	59.5	59.3	58.1 57.9 58.9 61.5 64.7 65.3 63.6 66.9 66.9 100

Figura 19: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos correspondentes ao genoma completo do VLV - CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.

Comparações feitas com o gene da CP para nucleotídeo e aminoácido incluindo também os demais isolados obtidos neste estudo mostram que os isolados 2666_16F04_*V. planifolia*_BAG, 2662_16F02_*V. planifolia*_BAG, 2661_16F01_*V. planifolia*_BAG, 2674_16F05_*Vanilla sp*_Pará, e 2674_*Vanilla sp*_Pará compartilham maiores identidades (>92,8% nt/>95,6% aa) com VLV-BR2 (Figura 20), sendo, portanto, considerados isolados de VLV-BR2. Já as comparações feitas com a CP para nucleotídeo e aminoácido incluindo demais isolados obtidos neste estudo mostram que os isolados 2663_C5_7109, 2689_C1_7109, 2689_C2_7109, 2689_C3_7109, 2695_7248F_C4, 2695_7248F_C5, 2695_CPFR_C1, 2662_CPFR_C1, 2662_CPFR_C2, 2689_CPFR_C1, 2689_CPFR_C3, 2690_CPFR_C1, 2695_CPFR_C3 e 2690_CPFR_C3 compartilham maiores identidades (>90,6% nt/>91,5% aa) com VLV-BR1 (Figura 20).

CP (nt)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
---	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL) 100

Figura 20: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos [CP (nt)] e aminoácidos [CP (aa)] correspondentes a CP de VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros isolados sequenciadas nesse trabalho e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.

Figura 21: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a RdRp VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.

Para o gene da TGB1, observamos percentuais de identidades de nucleotídeos de 68,8% e aminoácidos de 72,2% quando comparados par a par entre o VLV-BR1 e o VLV-CRV2148ALL (Figura 22). Enquanto percentuais de identidades de nucleotídeos de 95% e aminoácidos de 96,6% foram observados em comparações par a par entre o VLV-BR2 e o VLV-CRV2148ALL (Figura 22).

TGB1 (nt)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100														
VLV-BR1	68.8	100													
VLV-BR2	95.0	68.5	100												
JN053266_Blackberry_virus_E	52.9	54.5	52.6	100											
KX058345_Arachis_pintoi_virus	52.1	54.0	51.5	56.3	100										
MN031278_Senna_severe_yellow_mosaic_virus	54.4	52.2	54.4	55.3	52.7	100									
KY696659_Allexivirus_sigmamedicagonis	51.8	56.3	53.2	57.1	54.2	55.0	100								
PP097219_Rehmannia_allexivirus	54.1	52.2	53.5	57.0	57.0	53.3	54.9	100							
AB010300_Garlic_virus_A	54.8	53.9	53.6	53.8	53.4	51.8	58.6	51.3	100						
KF555653_Garlic_virus_D	59.2	51.8	54.6	53.4	55.4	50.4	55.1	53.9	63.9	100					
AJ292230_Garlic_virus_E	54.6	52.4	55.0	53.3	54.4	51.5	55.3	52.4	60.9	59.0	100				
M97264_Shallot_virus_X	54.0	54.4	55.4	54.8	55.4	56.0	55.6	54.8	64.7	66.1	60.1	100			
KM379144_Garlic_virus_B	52.9	53.6	54.5	51.8	56.2	53.2	52.7	53.3	56.9	59.8	57.7	57.4	100		
U89243_Garlic_virus_X	54.3	52.4	53.1	53.8	53.1	52.0	52.4	52.3	56.0	54.4	54.6	57.7	66.9	100	
AB010302_Garlic_virus_C	55.0	54.2	54.6	51.9	56.5	53.1	54.1	54.3	57.0	57.8	58.0	62.4	58.6	59.5	100

TGB1 (aa)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100														
VLV-BR1	72.2	100													
VLV-BR2	96.6	70.9	100												
JN053266_Blackberry_virus_E	47.0	46.5	47.0	100											
KX058345_Arachis_pintoi_virus	45.1	43.9	45.1	48.9	100										
MN031278_Senna_severe_yellow_mosaic_virus	52.2	49.8	50.4	49.8	47.0	100									
KY696659_Allexivirus_sigmamedicagonis	46.0	45.5	48.1	50.0	50.2	49.6	100								
PP097219_Rehmannia_allexivirus	45.9	44.9	44.6	46.4	42.4	44.3	41.9	100							
AB010300_Garlic_virus_A	43.8	41.7	43.0	48.3	42.2	46.2	45.7	40.0	100						
KF555653_Garlic_virus_D	43.8	39.4	44.2	47.8	46.8	47.0	46.5	44.9	62.0	100					
AJ292230_Garlic_virus_E	42.6	41.6	41.7	47.0	41.3	46.6	44.3	46.7	58.2	60.8	100				
M97264_Shallot_virus_X	43.8	43.0	43.8	46.6	45.3	48.3	46.1	42.1	63.1	66.2	62.2	100			
KM379144_Garlic_virus_B	45.2	41.3	45.4	43.8	49.3	44.7	45.2	47.2	55.2	57.2	56.8	57.2	100		
U89243_Garlic_virus_X	47.0	44.2	47.0	47.6	45.4	49.8	43.5	45.2	56.8	54.7	54.7	59.8	67.5	100	
AB010302_Garlic_virus_C	41.3	39.1	40.4	46.0	43.1	48.5	43.8	45.6	51.4	54.4	56.3	57.9	56.9	61.1	100

Figura 22: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a TGB1 VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.

Para o gene da TGB2, observamos percentuais de identidades de nucleotídeos de 79,9% e aminoácidos de 84,3% quando comparados par a par entre o VLV-BR1 e o VLV-CRV2148ALL (Figura 23). Enquanto percentuais de identidades de nucleotídeos de 98,7% e aminoácidos de 98% foram observados em comparações par a par entre o VLV-BR2 e o VLV-CRV2148ALL (Figura 23).

TGB2 (nt)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100														
VLV-BR1	79.9	100													
VLV-BR2	98.7	79.6	100												
JN053266_Blackberry_virus_E	55.3	55.3	55.3	100											
KX058345_Arachis_pintoi_virus	60.5	57.0	60.5	58.9	100										
MN031278_Senna_severe_yellow_mosaic_virus	56.3	57.0	55.3	58.4	58.4	100									
KY696659_Allexivirus_sigmamedicagonis	58.3	58.5	59.3	61.1	63.2	61.4	100								
PP097219_Rehmannia_allexivirus	56.8	53.9	56.4	58.3	52.8	56.1	55.8	100							
AB010300_Garlic_virus_A	60.2	57.8	59.5	58.5	55.1	54.4	54.5	58.2	100						
KF555653_Garlic_virus_D	55.3	57.8	55.3	53.2	57.6	55.7	54.3	55.3	79.2	100					
AJ292230_Garlic_virus_E	58.6	59.9	58.3	52.7	53.6	56.3	51.8	54.2	75.3	72.4	100				
M97264_Shallot_virus_X	57.4	57.5	57.4	55.8	56.5	59.3	56.8	55.2	66.3	66.7	62.8	100			
KM379144_Garlic_virus_B	57.4	56.7	57.1	56.0	54.3	54.5	52.8	51.3	61.9	58.8	59.3	61.1	100		
U89243_Garlic_virus_X	57.5	55.9	57.5	55.4	56.3	54.8	54.5	63.6	64.4	60.6	61.9	64.3	73.5	100	
AB010302_Garlic_virus_C	56.2	56.2	55.2	55.6	59.5	54.4	55.1	58.0	66.7	66.0	64.7	66.3	63.8	66.3	100

TGB2 (aa)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100														
VLV-BR1	84.3	100													
VLV-BR2	98.0	82.4	100												
JN053266_Blackberry_virus_E	46.5	46.5	45.5	100											
KX058345_Arachis_pintoi_virus	54.5	60.4	54.5	53.5	100										
MN031278_Senna_severe_yellow_mosaic_virus	50.5	51.5	50.5	49.0	53.0	100									
KY696659_Allexivirus_sigmamedicagonis	51.0	50.0	51.0	58.9	53.0	50.0	100								
PP097219_Rehmannia_allexivirus	50.5	52.0	49.5	46.6	49.0	43.6	51.0	100							
AB010300_Garlic_virus_A	51.5	52.5	50.5	41.7	47.1	44.9	48.0	47.5	100						
KF555653_Garlic_virus_D	50.5	53.5	49.5	42.7	51.0	46.9	48.0	44.7	78.6	100					
AJ292230_Garlic_virus_E	51.5	51.5	50.5	42.7	50.0	43.9	51.0	49.5	81.6	81.6	100				
M97264_Shallot_virus_X	47.5	49.5	46.5	45.6	45.1	46.9	51.0	47.6	62.1	62.1	59.2	100			
KM379144_Garlic_virus_B	43.6	45.1	43.6	42.9	43.8	37.8	49.0	43.6	50.5	44.7	48.5	53.4	100		
U89243_Garlic_virus_X	46.1	45.1	46.1	45.5	47.1	46.9	50.0	48.5	58.3	57.3	61.2	55.3	67.9	100	
AB010302_Garlic_virus_C	51.5	50.5	50.5	52.1	49.0	46.4	51.0	48.5	68.0	67.0	67.0	60.2	57.3	66.0	100

Figura 23: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a TGB2 VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.

Para o gene da TGB3, observamos percentuais de identidades de nucleotídeos de 85,5% e aminoácidos de 80,5% quando comparados par a par entre o VLV-BR1 e o VLV-CRV2148ALL (Figura 24). Enquanto percentuais de identidades de nucleotídeos e aminoácidos de 97,4% foram observados em comparações par a par entre o VLV-BR2 e o VLV-CRV2148ALL (Figura 24).

TGB3 (nt)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100								
VLV-BR1	85.5	100							
VLV-BR2	97.4	85.9	100						
JN053266_Blackberry_virus_E	54.2	52.9	54.2	100					
KX058345_Arachis_pintoi_virus	52.9	57.7	57.5	60.4	100				
MN031278_Senna_severe_yellow_mosaic_virus	53.5	54.5	54.2	57.3	54.7	100			
KY696659_Allexivirus_sigmamedicagonis	53.6	52.7	55.6	61.0	61.6	59.5	100		
PP097219_Rehmannia_allexivirus	50.2	48.6	52.7	57.0	55.2	50.2	50.8	100	

TBG3 (aa)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100								
VLV-BR1	80.5	100							
VLV-BR2	97.4	80.5	100						
JN053266_Blackberry_virus_E	40.8	41.4	39.4	100					
KX058345_Arachis_pintoi_virus	37.1	37.5	38.6	42.2	100				
MN031278_Senna_severe_yellow_mosaic_virus	34.2	38.4	32.4	46.0	38.2	100			
KY696659_Allexivirus_sigmamedicagonis	32.4	39.2	33.8	42.0	46.7	43.5	100		
PP097219_Rehmannia_allexivirus	31.1	38.0	39.1	35.1	32.9	39.5	37.3	100	

Figura 24: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a TGB3 VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.

Para o gene da P40, observamos percentuais de identidades de nucleotídeos de 62,9% e aminoácidos de 55,1% quando comparados par a par entre o VLV-BR1 e o VLV-CRV2148ALL (Figura 25). Enquanto percentuais de identidades de nucleotídeos de 94,8% e aminoácidos de 93,9% foram observados em comparações par a par entre o VLV-BR2 e o VLV-CRV2148ALL (Figura 25).

P40 (nt)

MF150239_Vanilla_latent_virus(CRV2148ALL)	100															
VLV-BR1	62.90	100														
VLV-BR2	94.80	63.80	100													
JN053266_Blackberry_virus_E	56.10	54.80	56.70	100												
KX058345_Arachis_pintoii_virus	50.40	52.30	53.60	56.30	100											
MN031278_Senna_severe_yellow_mosaic_virus	51.00	49.50	50.00	53.60	50.70	100										
KY696659_Allexivirus_sigmamedicagonis	52.30	55.80	53.00	56.00	52.80	51.90	100									
PP097219_Rehmannia_allexivirus	49.40	53.00	51.50	54.70	53.70	49.40	53.80	100								
AB010300_Garlic_virus_A	52.70	56.00	51.60	51.40	50.80	50.70	53.50	49.40	100							
KF555653_Garlic_virus_D	49.40	52.40	53.10	49.90	50.80	49.20	54.10	53.30	59.20	100						
AJ292230_Garlic_virus_E	51.30	53.50	50.70	51.90	50.50	48.70	51.10	49.50	58.50	60.00	100					
M97264_Shallot_virus_X	53.10	56.30	53.80	52.00	51.80	50.80	52.10	52.40	53.70	54.60	56.50	100				
KM379144_Garlic_virus_B	55.00	53.10	55.40	51.20	53.10	48.40	50.20	52.40	51.80	53.30	51.00	52.70	100			
U89243_Garlic_virus_X	55.70	53.90	53.80	53.00	48.50	53.60	50.50	51.10	55.00	54.60	54.50	55.80	60.30	100		
AB010302_Garlic_virus_C	50.10	51.70	51.90	54.70	51.90	50.40	52.30	53.60	56.60	55.50	54.90	53.60	53.90	56.40	100	

P40(aa)

[illegible]

Figura 25: Matriz com porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes a P40 VLV-CRV2148ALL (MF150239), VLV-BR1, VLV-BR2 e outros membros do gênero *Allexivirus*. A matriz foi obtida por alinhamento par a par gerados com o programa SDT utilizando alinhamento MAFFT.

Na análise filogenética, foram utilizadas inicialmente as sequências completas do VLV-BR1 e VLV-BR2 preditas neste estudo (Figura 11) e também sequências de nucleotídeos e aminoácidos da capa proteica (ORF 6/CP) do VLV-BR1 e VLV-BR2 assim como sequências correspondentes de isolados de VLV obtidas de diferentes espécies de baunilha. A filogenia dos genomas completos de VLV-BR1, VLV-BR2 mostram um cluster único com o VLV (MF150239 – CRV2148ALL), sendo o VLV-BR2 mais próximo evolutivamente do (MF150239 - CRV2148ALL), que o VLV-BR1 (Figura 26A).

De maneira similar, a filogenia da CP utilizando a sequência de nucleotídeos ou aminoácidos (Figura 26B e 26C), incluindo sequências de isolados de diferentes espécies de baunilhas obtidas nesse estudo, foi possível observar um grupo de isolados mais relacionados com VLV-BR1 e outro grupo de isolados com maior relacionamento com VLV-BR2 e VLV-CRV2148ALL (MF150239), mas que se agrupam em um clado único com sequências de VLV.

Os isolados provenientes das amostras 2661, 2662, 2666 e 2674 agrupam com VLV-BR2. Essas amostras são da espécie *V. planifolia* (2661, 2662 e 2666) com origem da Bahia e Rio de Janeiro. Tendo em vista que essa espécie de baunilha é uma das mais difundidas comercialmente no mundo, isso nos indica a possibilidade da ocorrência desse vírus no Brasil através de introdução por vias comerciais pelo estímulo à produção de baunilhas em solo nacional.

Como podemos observar na amostra desse mesmo grupamento que possui sua origem no Pará, região onde houveram iniciativas de plantio nos anos 2000 (HOMMA et al., 2006), mas que foi coletada em ecossistemas naturais e em uma planta de espécie não identificada (2674), o que nos faz questionar sobre a origem do VLV infectando baunilhas e das diferentes espécies de baunilha que podem ser permissivas ao VLV.

Para o VLV-BR1, temos isolados provenientes das amostras de *V. planifolia* 2662, 2663, 2689, 2690 e 2695. Essas amostras têm duas origens, sendo oriundas da Bahia, plantas 2662 e 2663 de uma coleção particular e as demais que foram usadas como matrizes são oriundas da Costa Rica. A questão da entrada do VLV-BR1 pode ter sido também por vias comerciais ou através de colecionadores.

A sua origem é incerta, mas os nossos resultados indicam que VLV ocorre nas Américas (Costa Rica e Brasil) e na África (Ilhas Reunião).

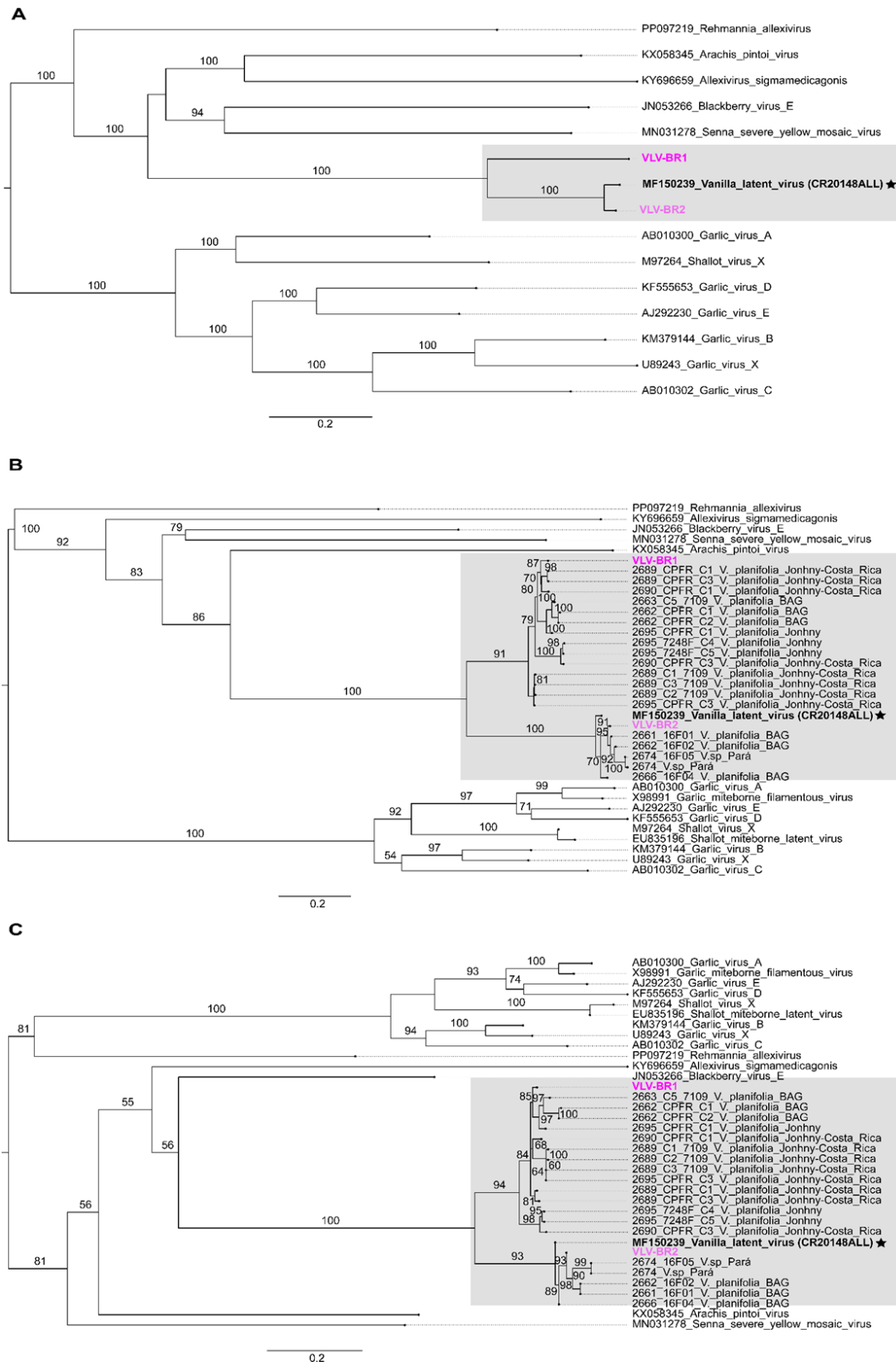


Figura 26: Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança enraizadas das sequências de nucleotídeos do genoma completo (A), capa proteica (B), e da sequência de aminoácidos da proteína da capa (C) do VLV-BR1 e VLV-BR2 e vírus exemplares que compõe o gênero *Allexivirus*. A árvore foi gerada no iqtree-2.3.6-Windows com 1.000 réplicas de bootstrap ultrarrápidas e a opção "encontrar e aplicar o melhor modelo". Apenas os valores de suporte de

ramificação acima de 50% são mostrados. Todos os números de acesso usados para construir a árvore estão listados na tabela 4.

Esses resultados mostram que nos isolados obtidos, temos a possível ocorrência de duas variantes para o VLV, sendo elas o VLV-BR1 e VLV-BR2, confirmadas através de análises por SDT e posteriormente por filogenia, tendo como base o critério de taxonomia de demarcação de novas espécies de *Allexivirus*. Logo, o VLV presente nas amostras do Pará e BAG Baunilha são isolados mais parecidos com o isolado já identificado nas Ilhas Reunião, enquanto os isolados de amostras *in vitro* são mais diversos, contudo, baseado no critério podem ser consideradas como variantes de uma mesma espécie. De toda forma, mais estudos a respeito da origem do VLV no Brasil devem ser feito, para compreendermos melhor a possível diversidade viral que possa existir do VLV, como uma possível recombinação viral, ou até mesmo uma adaptação local do vírus, já que foram detectados em regiões distintas.

6.5. Caracterização biológica do VLV-BR1 e VLV-BR2

Para a caracterização biológica e estudos de transmissão mecânica e de hospedeiros experimental de VLV-BR1 e VLV-BR2, foram feitos ensaios de inoculação mecânica com *N. benthamiana*. Optamos por testar uma planta modelo, pois o VLV identificado nas ilhas Reunião foi inoculado mecanicamente com sucesso em *V. planifolia*, *V. pompona* e *V. humblotii* (GRISONI et al., 2017).

Neste trabalho, as duas variantes VLV-BR1 e VLV-BR2 foram inoculadas em *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa* e *Chenopodium amaranticolor*. Inoculações feitas em plantas do gênero *Chenopodium* resultaram em detecções todas negativas.

As plantas de *N. benthamiana* inoculadas com VLV-BR1 e VLV-BR2 foram avaliadas aos 14 e 30 dias pós inoculação (dpi). Aos 14 dpi, apenas uma planta de 8 plantas inoculadas com VLV-BR2 (fonte de inóculo amostras 2666) teve resultado positivo em avaliação por RT-PCR, e em contrapartida nenhuma planta positiva foi obtida, das 9 inoculadas, com a fonte de inóculo amostra 2674. Entretanto, aos 30 dpi nenhuma planta foi positiva para os vírus. É possível que a quantidade de material infectado utilizado na inoculação, um dos fatores determinantes para o sucesso da inoculação (BEN CHÉHIDA et al., 2025), não tenha sido suficiente para uma infecção eficiente.

Nos ensaios com VLV-BR1 (fonte de inóculo 2663), nenhuma *N. benthamiana* foi positiva aos 14dpi ou 30dpi.

Com base nesses resultados, obtivemos uma baixa infectividade para os nossos isolados de VLV-BR1 e VLV-BR2 quando comparado com os estudos feitos na Ilha Reunião, onde foi detectado vírus em 25/85 *Vanilla planifolia*, 3/29 *Vanilla pompona* e 2/6 *Vanilla humblottii* (GRISONI et al., 2017). Porém é importante ressaltar que utilizamos uma espécie de planta (*N. benthamiana*) diferente da utilizada nos testes de (GRISONI et al., 2017) que utilizaram espécies de *Vanilla*, hospedeiras naturais do vírus. *N. benthamiana* aparentemente não é uma boa hospedeira para VLV. Como no caso das plantas inoculadas (e das demais plantas infectadas do estudo) no estudo da Ilha Reunião, onde nenhuma das plantas positivas apresentaram sintomas, mesmo um ano após inoculação, a planta positiva para o VLV-BR2 aos 14 dpi também não apresentou nenhum sintoma.

Todavia, não foram observados sintomas nas plantas infectadas com VLV para ambas as variantes, tanto para infecção simples dos isolados quanto para infecção mista, o que também foi observado em plantas com cultivos mais longevos (6 a 10 anos) no estudo da Ilha Reunião.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, identificamos pela primeira vez o VLV no Brasil sob a forma de duas possíveis variantes que denominamos de VLV-BR1 e VLV-BR2. A ocorrência inédita de VLV-BR1 por infecção simples em plantas de *V. planifolia* do BAG Baunilhas (2666) e em matrizes (2689, 2690, 2691 e 2695) estas oriundas da Costa Rica, destacando-se também a ocorrência em mudas clonais da amostra 2689. Além disso, temos a ocorrência de VLV-BR1 infectando *V. phaeantha* nas matrizes 2696 e 2698.

Para o VLV-BR2, identificamos novos hospedeiros para o VLV, com sua ocorrência em plantas de *V. cf. odorata* (2676) e *V. cf. hartii* (2686), além de *V. planifolia* (2661, 2666 e 3132) bem como de espécies de *Vanilla* ainda não identificadas definitivamente (2674, 3142 e 3143).

Foi identificada também a ocorrência de uma infecção mista para as duas variantes em uma planta *V. planifolia* (2662) do BAG Baunilhas.

Apesar de não ter sido um hospedeiro eficiente, plantas de *N. benthamiana* aparentemente suportam a replicação, mesmo que temporária do VLV.

Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar mais a respeito dos possíveis impactos oriundos da infecção por VLV, bem como a possível permissibilidade de infecção junto a outros vírus em um mesmo indivíduo.

Todavia, ainda existe muito a se estudar acerca dos vírus de baunilhas principalmente em espécies endêmicas do Brasil que possuem potencial econômico.

É de relevante importância mais estudos a respeito dos vírus que podem infectar diferentes espécies de baunilhas assim como a implementação de um programa de detecção e indexação viral, já que há proposições de multiplicação clonal de baunilhas para produção de mudas para serem utilizadas futuramente em plantios comerciais. Esses meios de indexação são também importantes para a implantação de plantios saudáveis e na detecção de vírus latentes, que a princípio podem não provocar prejuízos, mas que com o tempo podem se acumular nos cultivos e causar declínio do plantio.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Otimização da detecção simultânea de VLV-BR1 e VLV-BR2 em RT-PCR duplex ou com primer degenerado.
- Clonagem do gene da RdRP dos isolados de VLV-BR1 e VLV-BR2 e sequenciamento por Sanger.
- Caracterização biológica com gama de hospedeiros de VLV-BR1 e VLV-BR2
- Screening de plantas de *V. planifolia* e possivelmente outras espécies de baunilha em plantios comerciais para a presença de VLV-BR1, VLV-BR2.
- É necessário maior esforço no estudo para a detecção de vírus de DNA, uma vez que até o momento, não há relatos na literatura.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, M., CANDRESSE, T., HAMMOND, J., KREUZE, JF, MARTELLI, GP, NAMBA, S., PEARSON, MN, RYU, KH E VAIRA, AM. . ICTV. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/allexivirus>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2025.

AJJIKUTTIRA, P.;LIM-HO, C.;WOON, M.;RYU, K.;CHANG, C.;LOH, C. WONG, S. Genetic variability in the coat protein genes of two orchid viruses: Cymbidium mosaic virus and

Odontoglossum ringspot virus: Brief Report. **Archives of Virology**, v.147, n.10, p.1943-1954, 2002.

ALVES-FREITAS, D. M.;PINHEIRO-LIMA, B.;FARIA, J. C.;LACORTE, C.;RIBEIRO, S. G. MELO, F. L. Double-stranded RNA high-throughput sequencing reveals a new cytorhabdovirus in a bean golden mosaic virus-resistant common bean transgenic line. **Viruses**, v.11, n.1, p.90, 2019.

ANGIRA, A.;SHARMA, T.;CHOUDHARY, N.;RISHI, N.;VERMA, H. AWASTHI, L. Viral diseases of field and Horticultural Crops. In: (Ed.). **Viral Diseases of Field and Horticultural Crops**: Elsevier, 2024. Viral diseases of field and Horticultural Crops, p.15-21

BÁNKI, O., ROSKOV, Y., DÖRING, M., OWER, G., HERNÁNDEZ ROBLES, D. R., PLATA CORREDOR, C. A., STJERNEGAARD JEPPESEN, T., ÖRN, A., PAPE, T., HOBERN, D., GARNETT, S., LITTLE, H., DEWALT, R. E., MILLER, J., ORRELL, T., AALBU, R., ABBOTT, J., ABREU, C., ACERO P, A., ET AL. . Catalogue of Life (2025-10-10 XR). Catalogue of Life Foundation, Amsterdam, Netherlands. . <https://doi.org/10.48580/dgtpl> 2025.

BEN CHÉHIDA, S.;LACROIX, S.;HOAREAU, M.;FENELON, B.;VARSANI, A.;MARTIN, D. P.;TEYCHENEY, P.-Y.;LEFEUVRE, P. LETT, J.-M. To be or not to be a virus: A novel chimeric circular Rep-encoding single stranded DNA virus with interfamilial gene exchange illustrates the considerable evolutionary capacity of ssDNA viruses. **PLoS One**, v.20, n.8, p.e0309278, 2025.

BENEZET, H.;PICARD, E.;CÔME, B.;GRISONI, M.;LECLERCQ LE QUILLEC, F.;GAMBIN, O. JEUFFRAULT, E. Les virus du vanillier à la Réunion: un frein au développement de la culture sous ombrière. **Phytoma-La Défense des Végétaux**, v.(526), p. 40-42., 2000.

BESSE, P.;DA SILVA, D.;BORY, S.;NOIROT, M. GRISONI, M. Variation in intron length in caffeic acid O-methyltransferase (COMT) in Vanilla species (Orchidaceae). **Plant Science**, v.176, n.4, p.452-460, 2009.

BHADRAMURTHY, V.;BHAT, A. BIJU, C. Occurrence and coat protein sequence-based characterisation of Bean yellow mosaic virus (BYMV) associated with vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.44, n.18, p.1796-1801, 2011.

BHAT, A.;VENUGOPAL, M.;PANT, R. SUSEELA BHAI, R. Occurrence and distribution of viral diseases on vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v.13, n.2, p.143-148, 2004.

BIANCHETTI, L. D. B.;MIRANDA, Z.;VIEIRA, R.;ALVES, R. D. B.;BRUMANO, C.;DA SILVA, D. FIKENSCHER, C. **Cultivo de baunilha: práticas básicas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Pecuária. Brasília-DF. 2023

CANDRESSE, T.;FILLOUX, D.;MUHIRE, B.;JULIAN, C.;GALZI, S.;FORT, G.;BERNARDO, P.;DAUGROIS, J.-H.;FERNANDEZ, E. MARTIN, D. P. Appearances can be deceptive: revealing a hidden viral infection with deep sequencing in a plant quarantine context. **PLoS One**, v.9, n.7, p.e102945, 2014.

CHASE, M. W.;CAMERON, K. M.;FREUDENSTEIN, J. V.;PRIDGEON, A. M.;SALAZAR, G.;VAN DEN BERG, C. SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical journal of the Linnean Society**, v.177, n.2, p.151-174, 2015.

DĄBROWSKA, E.; LEWANDOWSKI, M.; KOCZKODAJ, S. PADUCH-CICHAL, E. Transmission of Garlic virus B, Garlic virus C, Garlic virus D and Garlic virus X by *Aceria tulipae* (Keifer) in leek. **European Journal of Plant Pathology**, v.157, n.1, p.215-222, 2020.

DE-BARROS LOPES, S. M. M. **Botânica Molecular Forense: O DNA na identificação de espécies vegetais**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto (Portugal), 2012.

DE NAZARÉ ALMEIDA DOS REIS, L.; FONSECA, M. E. D. N.; RIBEIRO, S. G.; NAITO, F. Y. B.; BOITEUX, L. S. PEREIRA-CARVALHO, R. D. C. Metagenomics of neotropical single-stranded DNA viruses in tomato cultivars with and without the Ty-1 gene. **Viruses**, v.12, n.8, p.819, 2020.

FAOSTAT. Value of Agricultural Production 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2025.

FARREYROL, K.; PEARSON, M. N.; GRISONI, M.; COHEN, D. BECK, D. Vanilla mosaic virus isolates from French Polynesia and the Cook Islands are Dasheen mosaic virus strains that exclusively infect vanilla. **Archives of Virology**, v.151, p.905-919, 2006.

FONTENELE, R. S.; ALVES-FREITAS, D. M.; SILVA, P. I.; FORESTI, J.; SILVA, P. R.; GODINHO, M. T.; VARSANI, A. RIBEIRO, S. G. Discovery of the first maize-infecting mastrevirus in the Americas using a vector-enabled metagenomics approach. **Archives of Virology**, v.163, p.263-267, 2018.

FOUCHÉ, J. G. JOUVE, L. Vanilla planifolia: history, botany and culture in Reunion island. **Agronomie**, v.19, n.8, p.689-703, 1999.

GODINHO, M. T.; PAULA, D. P.; VARSANI, A. RIBEIRO, S. G. Genome sequence of cauliflower mosaic virus identified in earwigs (*Doru luteipes*) through a metagenomic approach. **Genome Announcements**, v.5, n.11, p.10.1128/genomea.00043-17, 2017.

GRISONI, M.; MARAIS, A.; FILLOUX, D.; SAISON, A.; FAURE, C.; JULIAN, C.; THEIL, S.; CONTRERAS, S.; TEYCHENEY, P.-Y. ROUMAGNAC, P. Two novel Alphaflexiviridae members revealed by deep sequencing of the Vanilla (Orchidaceae) virome. **Archives of Virology**, v.162, n.12, p.3855-3861, 2017.

GRISONI, M.; MOLES, M.; FARREYROL, K.; RASSABY, L.; DAVIS, R. PEARSON, M. Identification of potyviruses infecting vanilla by direct sequencing of a short RT-PCR amplicon. **Plant Pathology**, v.55, n.4, p.523-529, 2006.

HEBERLÊ, D. Brasil ganha primeiro banco de germoplasma de baunilhas. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/72142965/brasil-ganha-primeiro-banco-de-germoplasma-de-baunilhas>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2022a.

HEBERLÊ, D. Embrapa capacita calungas e produtores rurais para produção de banilha brasileira. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/74600633/embrapa-capacita-calungas-e-produtores-rurais-para-producao-de-baunilha-brasileira>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2022b.

HINSLEY, A.; DE BOER, H. J.; FAY, M. F.; GALE, S. W.; GARDINER, L. M.; GUNASEKARA, R. S.; KUMAR, P.; MASTERS, S.; METUSALA, D. ROBERTS, D. L. A review of the trade in orchids and its implications for conservation. **Botanical journal of the Linnean Society**, v.186, n.4, p.435-455, 2018.

HOMMA, A.;DE MENEZES, A. DE MATOS, G. Cultivo de baunilha: uma alternativa para a agricultura familiar na Amazônia. **Embrapa Amazônia Oriental. Documentos**, v.254, 2006.

IESB. Conexão baunilha: o desafio e as oportunidades da cadeia produtiva no distrito federal. Disponível em: <https://www.iesb.br/noticias/conexao-baunilha-o-desafio-e-as-oportunidades-da-cadeia-produtiva-no-distrito-federal/>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2025.

JORNAL DE BRASÍLIA, J. D. Yes, nós temos baunilha! Conheça o cultivo da especiaria no DF. Disponível em: <https://jornaldebrasil.com.br/brasil/yes-nos-temos-baunilha-conheca-o-cultivo-da-especiaria-no-df/>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2023.

KACUNGIRA, N. Como a baunilha se tornou produto de luxo, mais caro que a prata, e mudou a vida de uma comunidade. Disponível em: www.bbc.com/portuguese/internacional-45245309. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2018.

KANG, S.-G.;KOO, B.-J.;LEE, E.-T. CHANG, M.-U. Allexivirus transmitted by eriophyid mites in garlic plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, n.11, p.1833, 2007.

KANYUKA, K.;VISHNICHENKO, V.;LEVAY, K.;KONDRIKOV, D. Y.;RYABOV, E. ZAVRIEV, S. Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. **Journal of General Virology**, v.73, n.10, p.2553-2560, 1992.

KEARSE, M.;MOIR, R.;WILSON, A.;STONES-HAVAS, S.;CHEUNG, M.;STURROCK, S.;BUXTON, S.;COOPER, A.;MARKOWITZ, S. DURAN, C. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v.28, n.12, p.1647-1649, 2012.

KITAJIMA, E.;BLUMENSCHN, A. COSTA, A. Rodlike particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.81, n.3, p.280-286, 1974.

KLEIN, E. H. S. **Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação in vitro de orquídeas no Estado do Rio de Janeiro**. Dissertação em Ciências, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

LAMAS, N. S.;FONTENELE, R. S.;MELO, F. L.;COSTA, A. F.;VARSANI, A. RIBEIRO, S. G. Complete genome sequence of a genomovirus associated with common bean plant leaves in Brazil. **Genome Announcements**, v.4, n.6, p.10.1128/genomea. 01247-16, 2016.

LE ROUX, K. **Characterisation and detection of viruses (Cucumovirus, Potyvirus) infecting vanilla in Réunion Island and Polynesian Islands**. Biological Sciences)--University of Auckland, 2005.

MADHUBALA, R.;BHADRAMURTHY, V.;BHAT, A.;HAREESH, P.;RETHEESH, S. BHAI, R. Occurrence of Cucumber mosaic virus on vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. **Journal of Biosciences**, v.30, p.339-350, 2005.

MAGALHÃES, I. P. **Cito-e histopatologia comparativa de tecido foliar de orquídeas infectadas pelo orchid fleck virus**. Universidade de São Paulo, 2024.

MANS, M. Baunilha começa a ganhar espaço em solo brasileiro. Disponível em: <https://www.terra.com.br/noticias/baunilha-comeca-a-ganhar-espaco-em-solo->

brasil.8c5653087eda0028e9f740f820e5f3811e2i1nz8.html. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2022.

MANSOURI, F. RYŠÁNEK, P. Allexivirus. **Phytopathologia Mediterranea**, v.60, n.3, p.389-402, 2021.

MATVIENKO, M. WORKBENCH, C. G. Plant and Animal Genome Sr Field Application Scientist. **Aarhus, DE: CLC Bio**, 2015.

MCGAVIN, W.;COWAN, G.;JONES, S. MACFARLANE, S. Mutation of the allexivirus-specific P40 gene of Wineberry latent virus, an isolate of Blackberry virus E, greatly reduces virus multiplication. **bioRxiv**, p.2024.06. 18.599508, 2024.

MEDEIROS, M. O.;DE ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I. M.;DA SILVA COSTA, F. H.;QUEIROZ, P. R. M.;ECKSTEIN, B.;DE SOUZA, A. L. X. SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Unveiling innovations for enhancing in vitro propagation of *Vanilla phaeantha* Rchb. f. through the use of double-phase technique and temporary immersion bioreactor systems. **Industrial Crops and Products**, v.216, p.118726, 2024.

MEENA, R. D.;BARANWAL, V. K.;LAL, G.;SHARMA, Y. K.;MEENA, S. S. MEENA, N. K. First report of *Vanilla distortion mosaic virus* on cumin (*Cuminum cyminum* L.) in India. **Journal of Plant Pathology**, v.104, n.2, p.877-877, 2022.

MELO, F. L.;FERNANDES, J. E. A.;RIBEIRO, B. M. RIBEIRO, S. G. Complete genome sequence of a tobacco-infecting, tomato-blistering mosaic virus. **Genome Announcements**, v.2, n.4, p.10.1128/genomea. 00701-14, 2014.

MENEGUZZO, T. E. C., N.U. Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12347>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2025.

MORAES, L. A.;KRAUSE-SAKATE, R. PAVAN, M. A. Incidence and characterization of viruses infecting orchids in São Paulo state, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.42, n.2, p.126-131, 2017.

MOROZOV, S. Y. SOLOVYEV, A. G. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. **Journal of General Virology**, v.84, n.6, p.1351-1366, 2003.

MOTTA, D. Pesquisadores na UniRio investigam a biodiversidade das baunilhas brasileiras. Disponível em: <https://www.faperj.br/?id=533.7.0#:~:text=E%20acrescentou:%20%E2%80%9CTrabalhamos%20tamb%C3%A9m%20na,Amaz%C3%B4nia%2C%20Cerrado%20e%20Mata%20Atl%C3%A2ntica>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2024.

MUHIRE, B. M.;VARSANI, A. MARTIN, D. P. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PLoS One**, v.9, n.9, p.e108277, 2014.

PEARSON, M.;BRUNT, A. PONE, S. Some hosts and properties of a potyvirus infecting *Vanilla fragrans* (Orchidaceae) in the Kingdom of Tonga. **Journal of Phytopathology**, v.128, n.1, p.46-54, 1990.

PÉREZ, A.;SÁNCHEZ-YALI, J.;HIGUITA, M.;ORTIZ-REYES, A. GUTIÉRREZ, P. A. Expanding the Orchidaceae Virome Through Analysis of Public-Domain Sequencing Data. **bioRxiv**, p.2025.04. 09.647952, 2025.

QIN, Y.; LU, S.; WEN, Y.; LI, S.; GAO, S.; LIU, Y.; LI, X.; YANG, J.; WANG, F. WANG, F. Genomic Characterization and Molecular Detection of Rehmannia Allexivirus Virus, a Novel Allexivirus Infecting Rehmannia glutinosa. **Microorganisms**, v.12, n.5, p.844, 2024.

RAIGOND, B.; VERMA, A.; PATHANIA, S.; KOCHHAR, T. CHAKRABARTI, S. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of potato virus a in potato and in insect vector aphids. **Crop Protection**, v.137, p.105296, 2020.

RECORD, A. Produção de baunilha no DF: saiba como é o cultivo de uma das especiarias mais caras do mundo. Disponível em: <https://noticias.r7.com/brasil/agro-record/video/producao-de-baunilha-no-df-saiba-como-e-o-cultivo-de-uma-das-especiarias-mais-caras-do-mundo-03022025/>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2025.

RICHARD, A.; FARREYROL, K.; RODIER, B.; LEOCE-MOUK-SAN, K.; WONG, M.; PEARSON, M. GRISONI, M. Control of virus diseases in intensively cultivated vanilla plots of French Polynesia. **Crop Protection**, v.28, n.10, p.870-877, 2009.

RODOLPHE, G.; SÉVERINE, B.; MICHEL, G. PASCALE, B. Biodiversity and evolution in the Vanilla genus. **The dynamical processes of biodiversity-case studies of evolution and spatial distribution**, p.1-27, 2011.

SABANADZOVIC, S.; ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N. TZANETAKIS, I. E. Blackberry virus E: an unusual flexivirus. **Archives of Virology**, v.156, p.1665-1669, 2011.

SANCHES, M. M.; LAMAS, N. S.; REIS, M. B. A.; ARIETA-SOSA, J. G.; ROMANO, E.; MELO, F. L. RIBEIRO, S. G. Genome assembly of Schlumbergera virus X infecting prickly pear (Opuntia cochenillifera) in Brazil. **Genome Announcements**, v.3, n.2, p.10.1128/genomea.00133-15, 2015.

TABOH, J. Beleza e funcionalidade: as orquídeas têm usos medicinais e alimentares. Disponível em: <https://www.voanews.com/a/not-just-for-show-orchids-have-medicinal-food-purposes-too/1861412.html>. Acesso em: 08, outubro, 2025. 2014.

VENKATARAMAN, S.; PRASAD, B. V. SELVARAJAN, R. RNA dependent RNA polymerases: insights from structure, function and evolution. **Viruses**, v.10, n.2, p.76, 2018.

VIDAL, A. H.; FELIX, G. P.; ABREU, E. F. M.; NOGUEIRA, I.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; FALEIRO, F. G.; FONTENELE, R. S.; PEIXOTO, J. R.; LACORTE, C. ROSA, R. C. C. Occurrence of lettuce chlorosis virus in Passiflora spp. in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v.103, p.443-447, 2021.

VIDAL, A. H.; LACORTE, C.; SANCHES, M. M.; ALVES-FREITAS, D. M.; ABREU, E. F.; PINHEIRO-LIMA, B.; ROSA, R. C. C.; JESUS, O. N.; CAMPOS, M. A. FELIX, G. P. Characterization of cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) from passion fruit in Brazil: evidence of a complex of species within CABYV isolates. **Viruses**, v.15, n.2, p.410, 2023.

WANG, Y. Y. PEARSON, M. Some characteristics of potyvirus isolates from Vanilla tahitensis in French Polynesia and the Cook Islands. **Journal of Phytopathology**, v.135, n.1, p.71-76, 1992.

WISLER, G. C.; ZETTLER, F. W. MU, L. Virus infections of Vanilla and other orchids in French Polynesia. **Plant Dis**, v.71, p.1125, 1987.

ZHU, L.-J.;SU, L.-Y.;CHEN, X.;PAN, S.;XIA, F.;HAN, Y.-H.;XU, Z. XU, Q. Characterization of the complete genome of a novel allexivirus infecting Sauropus androgynus in China. **Archives of Virology**, v.170, n.1, p.1-4, 2025.