

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Johnsongrass mosaic virus*
EM PLANTAS FORRAGEIRAS DOS GÊNEROS
*BRACHIARIA, PANICUM E PENNISETUM***

Karina Nascimento da Silva

Brasília-DF

2015

Karina Nascimento da Silva

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Johnsongrass mosaic virus*
EM PLANTAS FORRAGEIRAS DOS GÊNEROS
*BRACHIARIA, PANICUM E PENNISETUM***

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

Orientador:

Dr. Renato de Oliveira Resende

Brasília-DF

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Karina Nascimento

Caracterização molecular de *Johnsongrass mosaic virus* em plantas forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*/Karina Nascimento da Silva
Brasília, 2015.

p.111

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília

I. Molecular- JGMV

II. Universidade de Brasília. PPG/FIT

III. Caracterização molecular de *Johnsongrass mosaic virus* em plantas forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*

*Aos meus pais Humberto e Nazaré, pelo amor incondicional, pelo carinho, e pelo apoio durante toda minha vida acadêmica, **dedico.***

AGRADECIMENTOS

Ao aos meus pais amados Nazaré e Humberto, por todo amor e carinho que sempre me deram, obrigada por sempre me incentivarem a crescer, por nunca medir esforço para que eu alcance meus objetivos, obrigada pela educação que me deram, sempre ensinando-me a importância de construir os meus próprios valores e por sempre estarem feliz com meu sucesso.

Ao Dr. Renato de Oliveira Resende por sempre estar me incentivando, pelo exemplo de profissional, pelo exemplo de ser humano, pelo carinho e por sempre estar feliz com o meu sucesso. Obrigada por esses dois anos! E que venham os 4 anos de doutorado!

Ao meu namorado Rodrigo da Rocha Fragoso, por todo seu amor, por sempre me incentivar, por nunca me deixar desistir dos meus objetivos, muito obrigada por toda a ajuda nesta etapa final, por ser o meu companheiro nas horas de preocupações, tristeza, dúvidas e felicidades. Muito obrigada por tudo que você fez e faz por mim.

Ao Dr. Fernando Lucas Melo, por me ajudar a finalizar o meu trabalho, obrigada pela paciência e horas de ensinamento.

Agradeço de todo coração ao Professor Tatsuya Nagata, sempre disposto a me ajudar.

Aos meus companheiros do curso de pós-graduação em Fitopatologia pelos momentos de aprendizado e alegrias: Carina, Geane, Debora, Elenice, Ricardo, João, Danilo, muito obrigada por esses dois 2 anos.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal, Mariana Severo, Anelise Orílio, Rayane Nunes e Mikahil Leastro, por estarem sempre dispostos a me ajudar, por tornarem esses dois anos mais prazerosos.

A todos os meus amigos, que compreenderam a minha ausência e sempre me incentivaram, muito obrigada!

Aos funcionários e professores do Departamento de Fitopatologia pela orientação e atenção dispensada e ensinamentos.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de realização da minha pós-graduação.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora, a Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata pela atenção dispensada, em especial ao Dr. Enrique Moriones pela disponibilidade.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Dr. Renato de Oliveira Resende, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Embrapa Gado de Corte, Embrapa Gado de Leite, Embrapa Cerrados e Universidade de Brasília (UnB).

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Johnsongrass mosaic virus* EM
PLANTAS FORRAGEIRAS DOS GÊNEROS *BRACHIARIA*, *PANICUM* E
*PENNISETUM***

Karina Nascimento da Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA em ____/____/____ por:

Dr. Enrique Moriones Alonso

Unibersidad de Málaga - España (Examinador Externo)

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

Embrapa Hortaliças (Examinadora Interna)

Dr. Renato de Oliveira Resende

Departamento de Fitopatologia da
Universidade de Brasília (Orientador-Presidente)

Brasília-DF

2015

SUMÁRIO

RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
Introdução geral	1
Objetivo geral	3
Objetivos específicos	3
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	4
1. Principais gramíneas forrageiras cultivadas no Brasil	4
1.1. <i>Brachiaria</i>	4
1.2. <i>Panicum</i>	5
1.3. <i>Pennisetum</i>	7
2. Vírus que infectam plantas forrageiras	9
3. Família <i>Potyviridae</i>	10
4. <i>Johnsongrass Mosaic Virus</i> (JGMV)	19
5. Sequenciamento de alto desempenho (Next Generation Sequencing - NGS)	21
6. Sequenciamento de alto desempenho aplicada a virologia de planta	24
7. Referências bibliográficas	27

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Johnsongrass mosaic virus</i> EM PLANTAS FORRAGEIRAS DOS GÊNEROS <i>BRACHIARIA</i> , <i>PANICUM</i> E <i>PENNISETUM</i>	37
1. Introdução	37
2. Material e métodos	39
2.1. Obtenção dos isolados de JGMV	38
2.2. Microscopia eletrônica	38
2.3. Purificação viral	39
2.4. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática	40
2.5. Detecção de JGMV por RT-PCR nas plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho	40
2.6. Clonagem da CP de JGMV das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho	42
2.7. Isolamento da região 3' do genoma de JGMV - 3' RACE	43
2.8. Isolamento da região 5' do genoma de JGMV - 5' RACE	44
2.9. Árvore filogenética	46
3. Resultados	51
3.1. Microscopia eletrônica	51
3.2. Purificação viral e preparação de amostra para o sequenciamento	51

3.3. Detecção de JGMV em <i>Pennisetum purpureum</i> linhagem CNPGL00211	53
3.4. Sequenciamento do genoma completo do isolado JGMV-Penni e JGMV-BR utilizando a plataforma Illumina	56
3.5. Isolamento e sequenciamento da região 3' do genoma de JGMV	62
3.6. Isolamento e sequenciamento da região 5' do genoma de JGMV	63
3.7. Análise filogenética utilizando sequências de nucleotídeos e aminoácidos da poliproteína dos isolados JGMV-Penni e JGMV-BR	64
3.8. Amplificação e clonagem de JGMV por RT-PCR das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho	67
3.9. Análise filogenética utilizando a capa proteica	73
4. Discussão	77
4.1. Caracterização molecular de JGMV-Penni e JGMV-BR	78
4.2. Diversidade de isolados de JGMV por sequência nucleotídica de CP	85
5. Considerações finais e perspectivas	87
6. Referências bibliográficas	89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Vírus relatado infectando plantas de <i>Brachiaria</i> , <i>Panicum</i> e <i>Pennisetum</i> ..	9
Tabela 1.2: Características e funções das proteínas codificadas por <i>Potyvirus</i>	16
Tabela 2.1: Plantas utilizadas para o sequenciamento do genoma completo de <i>Johnsongrass mosaic virus</i>	39
Tabela 2.2: Etapas da PCR utilizado para amplificação dos genes da CP	42
Tabela 2.3: Conjunto de primers utilizados no isolamento da região 3'UTR	44
Tabela 2.4: Sequências do gênero <i>Potyvirus</i> utilizadas na árvore filogenética do genoma completo	46
Tabela 2.5: Porcentagem de identidade de nucleotídeo do genoma completo e de partes do genoma correspondendo a cada proteína do JGMV-BR com sequências de <i>Potyvirus</i> mais estreitamente relacionados	58
Tabela 2.6: Porcentagem de identidade de nucleotídeo do genoma parcial e de partes do genoma correspondendo a cada proteína do JGMV-Penni com sequências de <i>Potyvirus</i> mais estreitamente relacionados	58
Tabela 2.7: Prováveis sítios de clivagem das poliproteínas de JGMV-BR e JGMV-Penni	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Partícula viral alongada e flexuosa com simetria helicoidal característico de espécies da família Potyviridae	11
Figura 1.2: Organização genômica do gênero <i>Bymovirus</i> , o único gênero dentro da família com genoma bipartido	14
Figura 1.3: Organização genômica do gênero <i>Potyvirus</i>	15
Figura 2.1: Sintomas de vírus observados em bancos ativos de germoplasma da Embrapa	38
Figura 2.2: Esquema representativo do vetor plasmidial pGEM-T Easy Vector (Promega)	43
Figura 2.3: Microscopia eletrônica de transmissão	51
Figura: 2.4: Gel de RNA extraído a partir de amostra purificadas em colchão de sacarose 20%	52
Figura 2.5: Representação esquemática da organização genômica dos <i>Potyvirus</i> destacando a parte superior da região amplificada com primers PY11 e M10 via RT-PCR	53
Figura 2.6: Detecção de JGMV em PP-211 utilizando os primers universais para potyvirus PY11 e M10 amplificando um fragmento de aproximadamente 2 kb	54

Figura 2.7: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PP-211	54
Figura 2.8: Amplificação da região 3'UTR da CP de JGMV do acesso	62
Figura 2.9: Análise do produto de PCR em gel de agarose 1% mostrando os fragmentos amplificados da região 5'UTR via a técnica de 5' RACE	63
Figura 2.10: Árvore filogenética do genoma completo do JGMV e outros <i>Potyvirus</i> depositados no GenBank utilizando a sequência nucleotídica	65
Figure 2.11: Árvore filogenética do genoma completo do JGMV e outros <i>Potyvirus</i> depositados no GenBank utilizando a sequência peptídica	66
Figura 2.12: Representação esquemática da organização genômica dos <i>Potyvirus</i> indicando a região amplificada pelos primers JG9,413-R e JG8,352-F	67
Figura 2.13: Detecção de JGMV por RT-PCR das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho	68
Figura 2.14: Análise do produto de PCR em gel de agarose 1 % mostrando o produto específico de JGMV em <i>Panicum spp</i> e <i>Brachiaria spp</i>	68
Figura 2.15: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PM-09/2013	69
Figura 2.16: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PM-19/2004	70

Figura 2.17: Confirmação de clonagem da CP de JGMV dos acessos PM-207, HB e B-S73=3022	70
Figura 2.18: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PMI18/2009	71
Figura 2.19: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso BH-H6	71
Figura 2.20: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PM-H8	72
Figura 2.21: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso B-836	72
Figura 2.22: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso BB- B138	73
Figura 2.23: Matriz de comparação das sequências da capa proteica dos clones isolados das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho com isolados de JGMV da Austrália e EUA depositados no GenBank	75
Figura 2.24: Análise filogenética da capa proteica	76

RESUMO

Atualmente o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, somando 210 milhões de cabeças de gado para a produção de carne, leite e seus derivados. Com isso é o maior exportador de carne do mundo e o 2º maior produtor mundial, representando 16% desse comércio. Considerando a produção de leite, o Brasil ocupa a 3ª posição no mercado mundial. Tal produção ocorre em 48% das áreas ocupadas com atividades rurais, que são destinadas as pastagens naturais e cultivadas. As principais plantas forrageiras plantadas no Brasil são dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Pennisetum*, pertencentes à família *Poaceae* que têm como centro de origem e diversidade o continente africano. Plantas com sintomas de vírus, têm sido frequentemente encontradas, principalmente nos bancos de germoplasma da Embrapa Gado de Corte no estado do Mato Grosso do Sul, e da Embrapa Gado de Leite no estado da Bahia. Devido à falta de conhecimento do agente etiológico, o presente trabalho visou a identificação e caracterização de vírus em plantas forrageiras dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Pennisetum*. Utilizando a plataforma de sequenciamento de alto desempenho Illumina, foi identificado o *Johnsongrass mosaic virus*. Inicialmente foi realizado um sequenciamento a partir de um acesso de *Pennisetum*. Posteriormente, foi realizado um segundo sequenciamento usando amostra composta de 5 acessos de *Panicum* e 5 de *Brachiaria*. Com esses sequenciamentos foram obtidos dois genomas de JGMV, um com 9828 nt de extensão, excluindo a cauda poli (A) originário do sequenciamento de *Panicum* e *Brachiaria* (JGMV-BR), e o outro com 9649 nt de extensão excluindo a poli (A) e a região 5'UTR, originário do sequenciamento de *Pennisetum* (JGMV-Penni). A técnica do 5'RACE foi usada para o isolamento da região 5'UTR, somente para um vírus JGMV-BR. A 3'UTR para cada isolado também foi amplificada e sequenciada. As análises da sequência predita de aminoácidos possibilitaram a dedução dos sítios de clivagem, bem como a identificação das sequências e motivos conservados dentro da sequência de cada proteína. As análises de comparações do genoma de cada vírus revelaram identidade da capa proteica de 77% (nt) do isolado JGMV-BR e 78% (nt) do isolado JGMV-Penni com o JGMV australiano (NC_003606). De acordo com o critério de demarcação de espécie para *Potyvirus*, em que o limiar para a demarcação de espécie é de 76-77% de identidade nucleotídica, os dois isolados de JGMV são uma estirpe da mesma espécie. As árvores filogenéticas geradas utilizando as sequências nucleotídicas e peptídicas da poliproteína revelaram que os dois isolados brasileiros de JGMV são filogeneticamente relacionados com o JGMV australiano, e ambos são relacionados ao

Canna yellow streak virus. Além disso, várias espécies que infectam monocotiledôneas formaram um clado, onde JGMV se insere. A partir da sequência consenso do genoma completo de JGMV-BR, foram sintetizados *primers* específicos que correspondiam ao gene da capa proteica para a detecção de JGMV. Além disso, para avaliar a diversidade genética de JGMV, a partir dos 11 acessos utilizados no NGS, fragmentos gênicos de CP foram clonados e de 3 a 5 clones foram sequenciados para cada acesso avaliado. A matriz de comparação das sequências nucleotídicas da CP comparados com os isolados australianos e americanos variou de 77 a 82% de identidade nucleotídica. A árvore filogenética utilizando a sequência nucleotídica da CP, indica a presença de ao menos duas linhagens de JGMV, uma circulando nos EUA/Austrália e outra no Brasil. Além disso, é possível observar que alguns isolados de vírus foram encontrados em mais de um acesso e determinados acesso demonstraram a presença de mais de um isolado. Assim, como resultado deste trabalho, foi realizado o primeiro relato de JGMV no Brasil.

Palavras Chave: JGMV, NGS, *Panicum*, *Brachiaria*, *Pennisetum*, Diversidade viral

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende - UnB

ABSTRACT

Currently, Brazil has the largest commercial herd in the world, totaling 210 million head of cattle, for the production of meat, milk and dairy products. This makes it the largest exporter in the world meat and the 2nd largest producer, accounting for 16% of this trade. Considering milk production, Brazil is ranked 3rd in the world market. This production occurs in 48% of areas occupied by rural activities, which are used natural and cultivated pastures. The main forage crops planted in Brazil are *Panicum*, *Brachiaria* and *Pennisetum*, all belonging to the *Poaceae* family whose center of origin and diversity is in Africa. Plants with symptoms of virus have often been found, mainly in germoplasm banks Embrapa Beef Cattle in Mato Grosso do Sul, and the Embrapa Dairy Cattle in the state of Bahia. Due to lack of knowledge of the etiologic agent, the present study aimed to identify and characterize viruses in forages of *Panicum*, *Brachiaria* and *Pennisetum*. Using high performance platform Illumina sequencing, was identified *Johnsongrass mosaic virus*. Initially, sequencing was carried out from a *Pennisetum* line. A second sequencing was done using 5 of *Panicum* and 5 of *Brachiaria* lines. Thus, two genomes were obtained from JGMV, one with 9828 nt in length, excluding the poly (A) tail, from *Panicum* and *Brachiaria* (JGMV-BR), and the other with a length of 9649 nt, excluding the poly (A) and the 5'UTR region, from *Pennisetum* (JGMV-Penni). The 5'RACE technique was used for isolation of the 5'UTR of JGMV-BR. The 3'UTR for each isolate was also amplified and sequenced. Analysis of the predicted amino acid sequence permitted the deduction of the cleavage sites and the sequences and identifying the conserved motifs within the sequence of each protein. The genome comparisons analysis of each virus revealed identity of the coat protein of 77% (nt) of JGMV-BR and 78% (nt) of JGMV-Penni with JGMV Australian (NC_003606). According to the demarcation criterion for *Potyvirus*, where the threshold for species differentiation is 76-77% nucleotide identity, the two JGMV are isolated from a strain of the same species. Phylogenetic trees generated using the nucleotide and peptide sequence of the polyprotein revealed that the two Brazilian isolates of JGMV are phylogenetically related to the Australian JGMV, and both are related to *Canna yellow streak virus*. In addition, several species that infect monocots formed a clade where JGMV groups. From the consensus sequence of the complete genome of JGMV-BR specific primers were synthesized which corresponded to the gene for the coat protein detection JGMV. Furthermore, to evaluate the genetic diversity of JGMV, from 11 lines used in NGS CP gene fragments were cloned and 3 to 5 clones

were sequenced for each lines evaluated. The comparison of the nucleotide sequences of the matrix CP compared with the Australian and American isolates ranged 77-82% nucleotide identity. The phylogenetic tree using the nucleotide sequence of CP indicates the presence of at least two strains of JGMV, one circulating US / Australia and other in Brazil. Furthermore, it is possible to observe that some virus isolates were found in more than one line and certain line demonstrated the presence of more than one isolated. Thus, as a result of this work, we performed the first report of JGMV in Brazil.

Keywords: JGMV, NGS. *Panicum*, *Brachiaria* e *Pennisetum*, Viral diversity

Supervisor: Dr. Renato de Oliveira Resende - UnB

Introdução geral

A importância das pastagens no sistema produtivo brasileiro pode ser constatada pela área que ocupam no cenário agropecuário. Dispondo de 172,3 milhões de hectares, as pastagens tropicais naturais e plantadas (IBGE, 2007) representam a principal fonte de alimento para um rebanho bovino de aproximadamente 210 milhões de cabeças (PAP, 2013). O Brasil tem ocupado desde 2004 a posição de maior exportador de carne bovina do mundo, com um quinto da carne comercializada internacionalmente, que é vendida em mais de 180 países (MAPA, 2014).

Sabe-se que a produção de carne bovina no Brasil é baseada quase que exclusivamente em pastagens de gramíneas e leguminosas forrageiras. Em virtude dessa realidade, o Brasil tem um dos menores custos de produção de carne do mundo (FERRAZ e FELÍCIO, 2010). Nos países onde a produção de carne é baseada em sistema de confinamento, como nos EUA, Austrália e diversos países europeus, o processo de colheita da forragem demanda o uso intensivo de mão de obra, máquinas, equipamentos e combustível fóssil, ao passo que, no Brasil, essa colheita é feita predominantemente pelo próprio animal, por meio do pastejo. O resultado é a redução de custos, de impactos ambientais e a geração de um produto mais saudável, com qualidade nutricional elevada (DALEY et al., 2010).

De acordo com o Censo Agropecuário Brasileiro de 2006 (IBGE, 2007), a área de pastagem do país está diminuindo. Nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste essas áreas diminuíram, enquanto que apenas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil houve um aumento. Segundo MAPA (2013), as áreas de pastagens brasileiras diminuíram 8% entre 1975 e 2011, período em que o efetivo de bovinos dobrou, passando de 102,5 milhões para 204 milhões de cabeças. Isto se deve à adoção de novas tecnologias de melhoramento animal e técnicas de manejo de pastagens, mas principalmente, pela utilização de novas cultivares de forrageiras, sendo plantas mais adaptadas, mais produtivas e mais resistentes a pragas e doenças (JANK et al., 2005).

Desde o Censo Agropecuário de 1970, vem sendo observada uma redução na área de pastagem natural devido a substituição por pastagens plantadas. O baixo crescimento médio das áreas de pastagem brasileiras nos últimos 30 anos ocorre principalmente como

consequência da expansão das áreas agrícolas, do reflorestamento e da urbanização sobre as áreas originais de pastagem (DIAS-FILHO, 2014).

Um dos principais problemas nessas áreas destinadas a pecuária é a alta incidência de pastagens degradadas. Estima-se que cerca de 20% das pastagens mundiais (naturais e plantadas) estejam degradadas ou em processo de deterioração. Uma das principais causas da degradação é o manejo inadequado, em particular o uso sistemático de taxas de lotação que excedam a capacidade do pasto, o que dificulta a recuperação da área devido a ação intensiva do pastejo e do pisoteio (FAO 2009).

Em regiões de clima tropical e subtropical, as práticas inadequadas de manejo do pastejo também são apontadas como uma das principais causas de degradação das pastagens. Outras causas são a ausência de adubações periódicas, as falhas no estabelecimento da pastagem e os problemas bióticos, como o ataque de insetos-praga e a incidência de doenças (DIAS-FILHO, 2011).

O ataque de pragas e doenças é um outro problema importante das pastagens, assim como, em outras culturas, que restringe o potencial produtivo das plantas forrageiras. Em decorrência da intensificação no cultivo de pastagens, observou-se o aumento da intensidade de doenças que causam perdas em produtividade e qualidade das pastagens, como também, provocam a morte das plantas (VERZIGNASSI e FERNANDES, 2001).

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

Atualmente, várias doenças têm sido consideradas importantes para os sistemas de produção de pastagens como, por exemplo, a mela-das-sementes (*Claviceps sulcata*), o carvão (*Ustilago operta*), a ferrugem (*Puccinia levis* var. *panici-sanguinalis*), a mancha foliar (*Bipolaris maydis*), a cárie-do-sino (*Tilletia ayresii*), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e mortalidade do capim-marandu, de etiologia ainda não elucidada. Destacam-se como patógenos causadores desta doença os pertencentes aos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*, associados ou não a *Pratylenchus*. Os fitonematoides, especialmente os do gênero *Pratylenchus*, por serem polípagos, têm merecido destaque,

pelos prejuízos causados em sistemas integrados de lavoura-pecuária (MARCHI et al., 2011).

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

Objetivo geral

Diante da problemática observada em campo naturais, cultivados ou experimentais, os quais apresentam várias espécies forrageiras com sintomas virais semelhantes àqueles causados por potyvirus, o presente trabalho visou identificar e caracterizar molecularmente vírus presentes em gramíneas forrageiras.

Objetivos específicos:

- Identificar o agente causal de sintomas de mosaico ocorrendo naturalmente em forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Panicum*, e *Pennisetum* oriundas do banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte e Embrapa Gado de Leite.
- Caracterização molecular de JGMV por meio de sequenciamento de alto desempenho.
- Determinar a diversidade de JGMV ocorrendo nos acessos de forrageiras por meio de análise filogenética de sequência nucleotídica da Capa Proteica.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1. Principais gramíneas forrageiras cultivadas no Brasil

1.1. *Brachiaria* spp.

É um gênero constituído por aproximadamente 100 espécies, com a taxonomia ainda mal definida, tanto em termos de espécies componentes, como da sua inter-relação com outros gêneros. A origem da grande maioria das espécies do gênero *Brachiaria* é no continente africano, incluindo todas de importância para a pecuária tropical (VALLE et al., 2001).

Forrageiras do gênero *Brachiaria* desempenham um papel primordial na produção de carne e leite no Brasil, por viabilizarem a pecuária em solos ácidos e de baixa fertilidade, característicos dos cerrados brasileiros. Paralelamente, uma robusta indústria de produção de sementes coloca o Brasil como o maior produtor, consumidor e exportador mundial de sementes de forrageiras tropicais. A produção total é de cerca de 100 mil toneladas por ano, atingindo valores de mais de 200 milhões de euros devido a exportação para mais de 20 países de aproximadamente 10% da produção total (SOUZA et al., 2006).

Gramíneas forrageiras introduzidas, especialmente as do gênero *Brachiaria*, contribuíram decisivamente para o desenvolvimento da bovinocultura nacional fazendo do Brasil o segundo maior produtor e maior exportador mundial de carne bovina (ABIEC, 2009). Atualmente, cerca de 85% dos pastos cultivados são formados por forrageiras do gênero *Brachiaria* e sustentam o maior rebanho comercial do mundo. Pastagens de braquiária são formadas por cultivares apomíticas, ou seja, de reprodução assexuada por sementes formando monocultivos clonais, cuja vulnerabilidade genética coloca em risco os sistemas produtivos, especialmente no Centro-Oeste, Norte e Sudeste do país (MACEDO, 2006). Neste aspecto, o aumento da diversificação das pastagens pela obtenção de novas cultivares por meio do melhoramento é essencial e imprescindível. Este cenário de extensos monocultivos clonais de braquiárias é uma situação de grande risco, tornando os sistemas produtivos altamente vulneráveis a problemas fitossanitários (SOUZA et al., 2006).

A evolução da pecuária no Brasil está muito relacionada a pastagens do gênero *Brachiaria*, dada à expressividade da referida forrageira no País. No estado de Mato Grosso, *B. brizantha* ocupa a maioria dos 80 milhões de hectares de pastagens, sendo as

cultivares Marandu e Xaraés as mais plantadas. Grande parte destas áreas encontra-se em algum estágio de degradação, que pode estar associado com a presença de fungos fitopatogênicos (SANTOS et. al., 2007).

As espécies do gênero *Brachiaria* são as forrageiras predominantes, sobretudo nas regiões Centro-Oeste e Norte do país. Entre essas, *B. brizantha* cv. Marandu (capim-marandu, braquiarião ou brizantão) é a mais plantada (ANDRADE e VALENTIM, 2004).

A popularidade e aceitação do capim-marandu entre os pecuaristas resultaram na implantação de extensas áreas dessa gramínea no sistema de monocultivo. Tamaña adoção tornou o sistema de produção vulnerável aos estresses abióticos e/ou bióticos, capazes de reduzir a produtividade e a qualidade das forrageiras (VERZIGNASSI e FERNANDES, 2001). Problemas dessa natureza têm sido constatados nas regiões Centro-Oeste e Norte do país, onde extensas áreas de “braquiarião” se apresentam secas e mortas, constituindo entrave para a produção de carne. A mortalidade do capim-marandu (MCM), ou síndrome da morte do capim-marandu, como é denominada por alguns autores, tem progredido rápida e irreversivelmente, potencializando, assim, o processo de degradação das pastagens. Embora não se saiba com exatidão, são estimados mais de 500 mil hectares de pastagem com sintomas de mortalidade (DIAS-FILHO, 2006).

1.2. *Panicum* spp.

Panicum maximum Jacq. tem como sinônimo *Megathyrus maximus* (Jacq.) B. K. Simon e W. L. Jacobs, e pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae e gênero *Panicum*. O primeiro exemplar de *Panicum maximum* introduzido no Brasil tem como centro de origem a África do Leste (COMBES e PERNÈS, 1970), onde, geralmente, ocorrem em margens florestais e em pastagens sob sombra de árvores (JANK, 1995). Sua introdução no Brasil não é bem conhecida. Vários autores sugerem que os primeiros exemplares dessa espécie vieram da África para o País em navios negreiros, onde eram utilizados como cama para os escravos, e uma vez aqui, se alastraram rapidamente, dando origem a primeira cultivar, o capim Colônião (PARSONS, 1972; HERLING et al., 2001; JANK, 1995). Essa cultivar se adaptou tão bem às condições de solo e clima do Brasil, que em algumas regiões passou a ser considerado nativo. Grande parte da engorda de bovinos no País, até a década de 1980, foi baseada em Capim Colônião (JANK, 1995).

A revolução na pesquisa de novas cultivares de *P. maximum* aconteceu em 1982, quando a Embrapa Gado de Corte recebeu do Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), hoje Institut de Recherche pour le Développement (IRD), uma coleção com 426 acessos e 417 plantas sexuais de *P. maximum* (JANK et al., 2008). Desses acessos, os 25 melhores foram avaliados em uma Rede de Ensaios Regionais (JANK et al., 1993; JANK, 1995) e 7 foram selecionados para serem avaliados sob pastejo, em pequenas parcelas, das quais foram liberadas 2 cultivares, *P. maximum* cv. Tanzânia e *P. maximum* cv. Mombaça (JANK et al., 1994). Além desses lançamentos, outros acessos apresentaram características importantes, entre eles, o BRA-007102, que foi lançado posteriormente como *P. maximum* cv. Massai (JANK et al., 2008).

A primeira cultivar introduzida no Brasil foi a Tobiatã (1978), que foi selecionada na África e lançada pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) seguida pelas cultivares Tanzânia-1 e Mombaça em 1982, pertencentes a grupos apomíticos coletados no Quênia e Tanzânia, oriundos da coleção Francesa e lançadas no Brasil pela Embrapa Gado de Corte (CNPGC) (HERLING et al., 2001). Na década de 80, foram lançadas as primeiras cultivares de *P. maximum* resultantes de trabalhos de melhoramento genético e seleção realizados no Brasil. O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) lançou as cultivares Centenário e Centauro em 1986 e 1988, respectivamente. Em 1989, o Instituto de Zootecnia (IZ) lançou a cv. Aruana, a qual apresentava porte menor que o cv. Colômbio, colmos finos e emitia estolões. O Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), hoje Embrapa Cerrados, lançou, em 1990, a cultivar Vencedor, após avaliação entre outros híbridos, visando à utilização em solos de média e alta fertilidade (ARANOVICH, 1995). A última cultivar lançada pela Embrapa Gado de Corte (CNPGC), foi a Massai, em 2001, uma nova opção forrageira morfológicamente muito distinta das demais cultivares existentes no mercado, sendo um híbrido espontâneo entre *P. maximum* e *P. infestum* (ARAUJO et al., 2008).

A cultivar mais produtiva das três lançadas pela Embrapa Gado de Corte é o Capim Mombaça, 135% mais produtiva que o Capim Colômbio, em termos de massa seca de folhas, e 27% mais produtiva que o capim-tanzânia, que por sua vez, é 85% mais produtiva que o capim-colômbio. O Capim Massai tem produção de massa seca de folhas semelhante ao capim-colômbio. Todas essas cultivares apresentam maior porcentagem de folhas em sua

constituição que o Capim Colonião, mas a única que o supera quanto à produção de sementes é o Capim Tanzânia (JANK et al., 2008).

Panicum maximum divide o espaço no mercado sementeiro no Brasil com as braquiárias. Normalmente, cultivares de *P. maximum* são recomendadas para categorias animais mais exigentes e solos de melhor fertilidade, enquanto as braquiárias são, em geral, utilizadas para a cria e recria do rebanho, em solos mais fracos e ácidos, complementando-se como forrageiras importantes nos sistemas de produção de carne brasileiros. Também na produção de leite, e não só no Brasil, o *P. maximum* tem se revelado importante, seja para pastejo direto ou para silagem e feno (HACKER e JANK, 1998). As cultivares de *P. maximum* cv. Tanzânia e Mombaça lançadas pela Embrapa em 1990 e 1993, são responsáveis por 10% do mercado de sementes de forrageiras no Brasil (ANDRADE, 2001). Considerando que as cultivares de *P. maximum* disponíveis se reproduzem por apomixia, o que significa que suas populações são geneticamente homogêneas, a ocorrência de pragas e doenças coloca em risco a produção da forrageira, e conseqüentemente, o sistema de produção de carne e leite como um todo. Assim, o melhoramento genético de *P. maximum* visando desenvolvimento de cultivares com resistência natural a pragas é estratégico para esse gênero de forrageira, bem como, para as espécies de *Brachiaria*.

1.3. *Pennisetum*

O Capim Elefante pertence ao gênero *Pennisetum*, descoberto no início do século XX pelo Coronel Napier (BENNET, 1976). Este é nativo de regiões de solos de maior fertilidade da África Tropical. O possível centro de diversidade abrange desde Guiné, a oeste, até Moçambique e sul do Quênia, a leste, incluindo Angola e Rodésia (atual Zimbábue) ao sul (BRUNKEN, 1977). Foi introduzido no Brasil por mudas provenientes de Cuba em 1920, e se adaptou a diferentes tipos de solo, com exceção dos solos mal drenados. É uma planta que produz muita biomassa, o que exige solos férteis e não ácidos para uma boa produção. Apesar da alta produção de biomassa, apresenta a desvantagem de ser propagado vegetativamente (colmos), pois as sementes não são viáveis (OTERO, 1961).

O capim-elefante foi utilizado durante muitos anos, quase que exclusivamente para fornecimento de forragem verde aos animais. O interesse nesta forrageira intensificou-se nos últimos quinze anos, quando se constatou a possibilidade de aumento de produtividade

e redução da área explorada com a sua utilização para pastejo direto (RODRIGUES et al., 2001), principalmente em propriedades leiteiras (ARAUJO et al., 2008).

Desde o início da utilização da espécie, somente duas cultivares eram bem conhecidas, a cultivar Merker que apresentava colmos finos e lâminas foliares estreitas e a Napier que tinha como característica colmos grossos e lâminas foliares largas. Devido ao seu elevado potencial de produção de forragem de boa qualidade, houve uma rápida e ampla disseminação do capim-elefante por todo o país (CARVALHO, 1985). Atualmente, existem diversas cultivares disponíveis em instituições de pesquisa que apresentam diferenças quanto à morfologia, produção, valor nutritivo, ciclo vegetativo, preferência animal e relação folha/caule (SOUZA, 1991). A grande variabilidade genética levou a dificuldades para determinação do número real de cultivares de capim-elefante, visto que muitas vezes, uma mesma cultivar era introduzida em diversos locais sem que fossem mantidas as identificações originais, sendo então rebatizadas com nomes locais ou popularizadas (TCACENCO e BOTREL, 1994; ARAUJO et al., 2008).

O capim-elefante representa um importante recurso genético para melhoristas, pois possui várias cultivares e híbridos que apresentam alta produção e forragem de bom valor nutritivo (ARAUJO et al., 2008). Entretanto, a produção comercial da semente, até o momento, é inviável por ser uma espécie protogênica, isto é, o estigma se desenvolve, murcha e morre antes da maturação das anteras, e alógama por possuir alta heterozigose das sementes formadas, o que gera populações de plantas desuniformes (CARVALHO, 1985).

Os bancos de germoplasma possuem diversidade de plantas de uma espécie, tendo como objetivo principal a preservação, por tempo indeterminado, dos recursos genéticos neles contidos (PEREIRA, 1994). O Banco de Germoplasma de Capim-elefante (BAGCE) da Embrapa Gado de Leite (CNPGL) constitui um dos mais completos do país, contendo vários acessos desta espécie, reunindo clones e populações variáveis de materiais cultivados e silvestres e raças cromossômicas obtidas por cruzamentos interespecíficos (ARAUJO et al., 2008).

2. Vírus que infectam plantas forrageiras

A ocorrência de vírus infectando espécies de plantas forrageiras no Brasil ainda é pouco relatada e os danos econômicos são desconhecidos. Até o momento, são poucos os vírus que foram detectados infectando naturalmente plantas dos gêneros *Brachiaria* spp., *Panicum* spp. e *P. purpureum.*, e que tiveram suas espécies identificadas. Já foram relatadas no mundo 18 espécies virais infectando plantas forrageiras, pertencentes a 9 famílias de vírus de planta: *Potyviridae*, *Geminiviridae*, *Tombusviridae*, *Luteoviridae*, *Caulimoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bromoviridae*, *Secoviridae* e *Reoviridae*, que estão descritas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Vírus relatado infectando acessos de *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum* (adaptado de LAPIERRE e SIGNORET, 2004).

Vírus	Hospedeiro	Família e Gênero
<i>Johnsongrass mosaic virus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>
<i>Sugarcane mosaic virus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>
<i>Panicum streak virus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i>	<i>Geminiviridae</i> <i>Mastrevirus</i>
<i>Maize dwarf mosaic virus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Pennisetum</i> <i>Panicum</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>
<i>Maize streak virus</i>	<i>Brachiaria</i> , <i>Pennisetum</i> <i>Panicum</i>	<i>Geminiviridae</i> <i>Mastrevirus</i>
<i>Panicum mosaic virus</i>	<i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>	<i>Tombusviridae</i> <i>sobemovirus</i>
<i>Satellite Panicum mosaic virus</i>	<i>Panicum</i>	Desconhecido
<i>Guinea grass mosaic virus</i>	<i>Panicum</i> , <i>Brachiaria</i> <i>Pennisetum</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	<i>Panicum</i> <i>Pennisetum</i>	<i>Luteoviridae</i> Gênero desconhecido

<i>Elephant grass mosaic virus</i>	<i>Pennisetum</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>
<i>Pennisetum mosaic virus</i>	<i>Pennisetum</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>
<i>Sorghum mosaic Potyvirus</i>	<i>Pennisetum</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>
<i>Zea mosaic Potyvirus</i>	<i>Pennisetum</i>	<i>Potyviridae</i> <i>Potyvirus</i>
<i>Sugarcane bacilliform virus</i>	<i>Brachiaria</i> <i>Panicum</i>	<i>Caulimoviridae</i> <i>Badnavirus</i>
<i>Digitaria striate virus</i>	<i>Brachiaria</i>	<i>Rhabdoviridae</i> <i>Nucleorhabdovirus</i>
<i>Brome mosaic virus</i>	<i>Pennisetum</i>	<i>Bromoviridae</i> <i>Bromovirus</i>
<i>Maize chlorotic dwarf virus</i>	<i>Pennisetum</i> <i>Panicum</i>	<i>Secoviridae</i> <i>Waikavirus</i>
<i>Rice black streak dwarf Fiji virus</i>	<i>Panicum</i>	<i>Reoviridae</i> <i>Fijivirus</i>

Os vírus infectando plantas forrageiras mais disseminados no mundo que mais se destacam são espécies da família *Potyviridae* (vide Tabela 1.1), e que também parecem ser as mais difundidas no Brasil, merecendo um estudo mais aprofundado.

3. Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* representa uma das maiores famílias de vírus de plantas já estudada. Do ponto de vista econômico, representa um grupo de vírus importante para a agricultura, causando doenças em diversas culturas. Atualmente possui 177 espécies aceitas como pertencentes a essa família, menor apenas que a família *Geminiviridae* que possui 325 espécies relatadas. Segundo o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) as 177 espécies desta família estão distribuídas em 8 gêneros (*Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*; ADAMS et al., 2011). A classificação dos 8 gêneros da família *Potyviridae* é baseada no

vetor de transmissão, gama de hospedeiros e organização genômica (FAUQUET et al., 2005).

Os vírus pertencentes à família *Potyviridae* possuem partículas flexuosas e filamentosas não envelopadas (Figura 1.1), medindo de 11 a 15 nm de diâmetro. O comprimento da partícula difere entre os 8 gêneros pertencentes a essa família. Membros dos gêneros *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Poacevirus* e *Brambyvirus* são, em sua maioria, monopartidos e possuem partículas com tamanho de 650-900 nm. Já os do gênero *Bymovirus* são quase sempre bipartidos e possuem partículas com comprimento de 250-300 e 500-600 nm (ADAMS et al., 2011).

De forma geral, o material genético é composto por uma ou duas moléculas de RNA fita simples sentido positivo, sendo protegido pela proteína da capa (CP). O tamanho do genoma dos membros monopartidos são de 8 a 11 kb, e dos membros bipartidos são de 7,5 kb e 3,5 kb. O RNA genômico possui uma VPg ligada covalentemente a extremidade 5' do RNA, e uma cauda poli (A) na extremidade 3'. O RNA codifica uma poliproteína que é auto-clivada em um conjunto de proteínas funcionais importantes para o ciclo de replicação dos vírus. As sequências dos genes e proteínas são conservadas entre membros desta família (ADAMS et al., 2011).



Figura 1.1: Partícula viral alongada e flexuosa com simetria helicoidal característico de espécies da família *Potyviridae*.

Adaptado: Viralzone

Os vírus pertencentes ao gênero *Brambyvirus* possuem espécies distintas dos outros membros da família *Potyviridae*, pois a proteína P1, com 83,6 kDa é maior do que a dos outros membros da família, contém um domínio AlkB, característicos de vírus que infectam hospedeiros da família *Rosaceae*, sendo também encontrados em procariotos, eucariotos e em vírus, pois estão envolvidos na alquilação (usualmente metilação) de ácido nucléico (ROTT e JELKMANN, 2005; HALGREN et al., 2007). A partícula viral possui 11-15 nm de diâmetro e 800 nm de comprimento, e o genoma possui cerca de 11 kb de tamanho. Além da diferença apresentada no tamanho da P1 e por ser filogeneticamente distinta de outros vírus, a organização genômica dos vírus pertencentes a esse gênero é idêntica à da maioria dos vírus monopartidos pertencentes a família *Potyviridae* (SUSAIMUTHU et al., 2008).

Por outro lado, os vírus pertencentes ao gênero *Ipomovirus* são distintos dos outros gêneros pertencentes à família por serem transmitidos por mosca branca (*Bemisia tabaci*) e por serem filogeneticamente distintos de outros membros da família. A partícula viral possui um tamanho de 800-950 nm de comprimento e o genoma possui cerca de 10 kb. Os vírus pertencentes a este grupo possuem usualmente uma variabilidade estrutural. A organização genômica de SPMMV (*Sweet potato mild mottle virus*), que é a espécie tipo do gênero, é semelhante a de outros *Potyvirus*, entretanto alguns motivos na HC-Pro e na CP que são característicos de *Potyvirus*, por serem transmitidos por afídeos, não estão presentes neste grupo de vírus, o que pode contribuir para a sua relação vetorial com moscas brancas. A P1 não possui o domínio AlkB, e por isso difere de *Brambyvirus* (ADAMS et al., 2011). *Cucumber vein yellowing virus* e *Squash vein yellowing virus* (CVYV e SqVYV) diferem de SPMMV pela proteína P1 possuir duas cópias (P1a e P1b), em que a P1b possui função de supressora do silenciamento gênico (VALLI et al., 2006). Nenhuma relação sorológica com outros membros da família *Potyviridae* foi encontrada (ADAMS et al., 2011).

O gênero *Macluravirus* assemelha-se aos membros do gênero *Potyvirus* por serem transmitidos por pulgões. A espécie tipo deste gênero é *Maclura mosaic virus*. Os vírus deste grupo são geralmente menores, pois possuem partícula viral que variam de 650-675 nm, e o tamanho do genoma é de 8 kb. Eles formam um grupo distinto filogeneticamente e possuem diferenças no sítio de clivagem da poliproteína (ADAMS et al., 2011).

O gênero *Rymovirus* contém apenas três vírus, que são presumivelmente transmitidos por populações de ácaros de forma semi-persistente. A transmissão por ácaros e a mecânica já foram relatadas para a maioria dos membros. Os ácaros que transmitem os *rymovirus* são diferentes daqueles que transmitem os vírus pertencentes ao gênero *Tritimovirus*. *Abacarus hystrix* transmite tanto RGMV (*Ryegrass mosaic virus*) quanto o AgMV (*Agropyron mosaic virus*), mas somente o primeiro é transmitido de forma eficiente. Nenhum vetor é conhecido como responsável pela transmissão de HoMV (*Hordeum mosaic virus*). As partículas desses vírus são de 690-720 nm de comprimento por 11-15 nm de largura, e o tamanho do genoma é de 9,5 kb. A espécie tipo deste gênero é *Ryegrass mosaic virus* (ADAMS et al., 2011).

Os vírus do gênero *Tritimovirus* são transmitidas por ácaros e formam um grupo filogenético distinto. A partícula possui 690-700 nm, e o genoma possui tamanho de 9,4 a 9,6 kb. A espécie tipo do gênero é *Wheat streak mosaic virus*. Os motivos presentes na poliproteína de *Potyvirus* também estão presentes nas proteínas de vírus do gênero *Tritimovirus*, entretanto alguns motivos na HC-Pro e na CP, que são característicos de *Potyvirus*, não estão presentes neste grupo de vírus, o que contribui para que os vírus pertencentes a esse grupo sejam transmitidos por ácaros (ADAMS et al., 2011).

O gênero *Bymovirus* é o único gênero dentro da família *Potyviridae* que possui genoma bipartido, possui o RNA1 com 7,5 a 8,0 kb, e RNA2 com 3,5 a 4,0 kb. As duas moléculas de RNA são traduzidas em duas poliproteínas, que por sua vez sofrem processamento proteolítico, gerando 10 proteínas funcionais. O tamanho da partícula viral varia de 250-300 nm, ambos com 13 nm de largura. A organização do RNA1 é semelhante a de outros *Potyvirus*, exceto pela proteína P1 que se encontra no RNA2, e a HC-Pro que não está presente no genoma do grupo de vírus pertencente a esse gênero. O RNA2 codifica uma poliproteína presente somente em *Bymovirus* (Figura 1.2). Acredita-se que a proteína P2 possa estar envolvida na transmissão pelo vetor. Esse vírus é transmitido pelo fungo *Polymyxa graminis* de maneira persistente, sobrevivendo em esporos, desde que estes continuem viáveis, e sendo transmitido experimentalmente por inoculação mecânica. A gama de hospedeiro é restrita somente à família *Gramineae* (ADAMS et al., 2011).

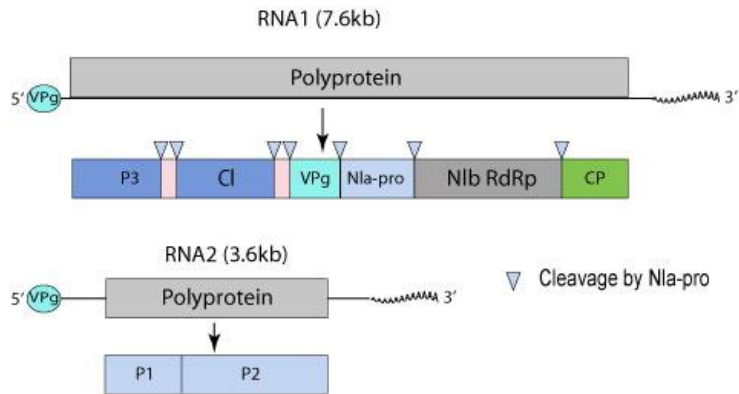


Figura 1.2: Organização genômica do gênero *Bymovirus*, o único gênero dentro da família com genoma bipartido. Este genoma é composto por RNA1 de 7,6-7,8 kb e RNA2 de 3,5-3,8 kb. Na extremidade 3' tem uma cauda poli (A) e na extremidade 5' possui uma proteína ligada ao genoma, a VPg. Adaptado de Viralzone.

No ano de 2009, TATINENI et al. propuseram um novo gênero para a família *Potyviridae*, chamado *Poacevirus*. Assim como os demais gêneros, caracteriza-se por possuir partículas flexuosas filamentosas, corpos de inclusão em células de plantas infectadas e por ter o genoma expressando uma poliproteína. Apesar de serem transmitidos por ácaro, os *Poacevirus* são filogeneticamente distintos de vírus de outros gêneros que são transmitidos pelo mesmo vetor. O genoma possui uma diferença marcante: a 5'UTR é maior (> 700 nt), quando comparadas com outros gêneros dentro da família. O nome do gênero é derivado da família *Poaceae*, que é o nome da família das plantas hospedeiras (TATINENI et al., 2009).

O gênero *Potyvirus* é o mais importante e numeroso dentre os gêneros pertencentes à família *Potyviridae*, pois os vírus deste gênero infecta uma ampla variedade de plantas tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, sendo assim responsáveis por grandes perdas econômicas. Esse gênero é caracterizado por possuir partículas filamentosas flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. O genoma dos vírus é monopartido, composto de RNA fita simples senso positivo, codificando uma única poliproteína, que após processos de clivagem geram 10 proteínas maduras e uma proteína incorporada na região codificadora para a proteína P3, denominada PIPO (Figura 1.3) (KING et al., 2012). Esta ORF é traduzida e sua expressão ocorre pela fusão da proteína P3, responsável pela replicação e desenvolvimento de sintomas na região N-terminal (P3N-

PIPO). A extremidade 5' do genoma dos *Potyvirus* é covalentemente ligada a uma proteína de origem viral, denominada de VPg, e a extremidade 3' é poliadenilada (ADAMS et al., 2005). A proteína CI forma inclusões cilíndricas denominadas “cata-vento”, que é uma característica taxonômica importante de espécies classificadas na família *Potyviridae*. Já a proteína NIB (Nuclear inclusion b), forma inclusões nucleares, assim como a proteína NIA (Nuclear inclusion a - VPg-Pro). A CP (proteína da capa) é responsável pelo movimento viral e pela transmissão do vírus pelo inseto vetor. A 6K1 é uma proteína de pequeno tamanho, porém com função desconhecida. A 6K2 é também uma pequena proteína transmembrana envolvida no processo replicativo do vírus no retículo endoplasmático. A P1 é a proteína menos conservada em sequência e mais variável em tamanho. Está envolvida na replicação, na supressão do silenciamento gênico e possui um domínio de protease de serina para a clivagem no C-terminal da P1. Por fim, a HC-Pro é importante principalmente na transmissão por vetor e pela supressão do silenciamento gênico (Tabela 1.2) (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001).

Nos últimos anos, um melhor entendimento da biologia dos *Potyvirus* tem sido obtido por meio da análise de transcrito, proteoma e metaboloma de hospedeiros durante o ciclo de infecção dos vírus, melhorando também o conhecimento das interações de proteínas vírus-hospedeiro e uma visualização mais abrangente do processo de infecção (ALFENAS-ZERBINI et al., 2009; PRASCH e SONNEWALD, 2013; YANG et al., 2007, 2011; ELENA e RODRIGO, 2012).

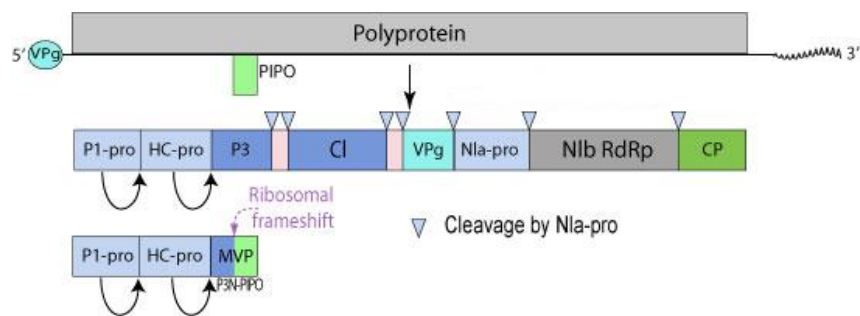


Figura 1.3: Organização genômica do gênero *Potyvirus*. O genoma é monopartido, linear, composto por um +ssRNA de 10 kb em tamanho. Na extremidade 3' tem uma cauda poli (A) e na extremidade 5' possui uma proteína ligada ao genoma, a VPg. Adaptado: Viralzone.

Tabela 1.2: Características e funções das proteínas codificadas por *Potyvirus*.

Proteínas	Massa Molecular (kDa)	Função
P1	32-64	Serina Proteinase, auto-clivagem C-terminal Sintomatologia
HC-Pro	56-58	Cisteína Proteinase, auto-clivagem C-terminal Transmissão por afídeo Movimento sistêmico Sinergismo com outros vírus Desenvolvimento de sintomas Supressão do silenciamento gênico
P3	37	Patogenicidade
6K1	6	Função desconhecida
CI	70	ATPase/RNA helicase Movimento célula-célula
6K2	6	Ligação ao complexo viral de replicação do genoma
VPg	21-24	Funciona como primer para a replicação do genoma Interação com fatores de tradução eIF4E Envolvida na supressão do silenciamento gênico
NIa-Pro	49	Serina Proteinase, clivagem da poliproteína em <i>cis</i> e <i>trans</i> Interação proteína- proteína
NIb	58	RNA polimerase dependente de RNA Replicação do genoma
CP	28-40	Transmissão por vetor Movimento viral Amplificação do genoma
PIPO		Movimento viral

(Adaptado: URCUQUI-INCHIMA et al., 2001; CHUNG et al., 2008)

Uma característica importante das proteínas codificadas pelos *Potyvirus* é que elas são multifuncionais, e que todas essas proteínas estão envolvidas no processo de amplificação do genoma e do ciclo de infecção, com exceção das proteínas P3, 6K1 e 6K2, que se ligam ao RNA (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001).

A CP (proteína da capa) dos *Potyvirus* já foi caracterizada com detalhes (SHUKLA e WARD, 1989), e pode ser dividida em três domínios: os domínios variáveis N- e C-terminal, que estão expostos na superfície da partícula, e uma região central mais

conservada. O domínio N-terminal contém os principais epítomos específicos do vírus. A CP está envolvida na transmissão por pulgão, no movimento célula-a-célula, no movimento sistêmico, na encapsidação do RNA e na regulação da amplificação do RNA viral (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001).

As espécies de vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* são transmitidas naturalmente por afídeos de maneira não persistente, isto é de maneira não circulativa, requerendo assim, um período de aquisição curto de alguns segundos ou poucos minutos. Dessa forma, o período de latência é ausente e período de retenção é curto, inferior a uma hora. Para esse tipo de transmissão, um período de jejum para a pré-aquisição aumenta a eficiência de transmissão. Um período de aquisição superior a cinco minutos diminui esta eficiência (HOLLINGS e BRUNT, 1981).

Para que ocorra a transmissão por afídeo, duas proteínas importantes são requeridas neste processo, a HC-Pro (*Helper Component*) e a CP, quando refere-se ao motivo DAG (GAL-ON et al., 1992).

A HC-Pro é uma proteína multifuncional, pois além de estar envolvida na transmissão por afídeos, pela presença dos motivos KITC, PTK e CCC, é uma proteína que tem a capacidade de auto-interação, determinando sua conformação, tem atividade de proteinase, é responsável pelo movimento sistêmico do vírus, pois mutações nos motivos conservados Ile-Gly-Asn (IGN) ou Cys (Cys: Ser) -Cys (CC: SC), na região central, aboliu o movimento sistêmico dos vírus e, respectivamente, à amplificação do RNA (GUO et al., 1999). HC-Pro está envolvida na amplificação do genoma, por possuir afinidade com o RNA, sendo também responsável pela supressão do PTGS (Silenciamento gênico pós-transcricional) e está envolvida no sinergismo viral influenciando no aumento dos sintomas em plantas hospedeiras. Assim, os três motivos importantes conservados na HC-Pro são IGN, CC:SC e PTK, motivos implicados na amplificação de RNA, na circulação sistêmica do vírus e na transmissão por pulgão respectivamente (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001).

Os *Potyvirus* induzem a formação de inclusões citoplasmáticas cilíndricas (CI) durante a infecção (EDWARDSON, 1966). As CI são agregados da proteína viral de 70 kDa que se acumulam dentro de diferentes compartimentos celulares, formando estruturas estáveis denominadas corpos de inclusões do tipo “cata-vento”. As inclusões nucleares cristalinas (NI), sendo essa inclusão um resultado da produção excessiva das proteínas NIa

e NIB (KNUHTSEN et al., 1974). Para a maioria dos *Potyvirus*, NIa é co-localizada com o NIB em corpos de inclusão no núcleo de células infectadas. No entanto análises mais detalhadas revelaram que esta localização pode variar para diferentes *Potyvirus* (RIEDEL et al., 1998). No caso de *Peanut stripe virus* (PSTV) NIa e NIB acumula no núcleo sem a formação de corpos de inclusão, porém, quando NIa e NIB foram expressas separadamente como proteínas de fusão com um gene repórter, NIa foi localizada no núcleo, enquanto que o NIB acumulava-se no citoplasma (HAJIMORAD et al., 1996). Esta situação indica que, pelo menos, NIa possui um sinal de localização nuclear (NLS) funcional e que NIB co-localiza-se no núcleo com NIa através da interação proteína-proteína (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001).

Segundo o último relatório do ICTV de 2011, os critérios para a demarcação de espécies dentro da família são: a sequência do genoma (sequências de aminoácidos da CP menor 80% de identidade, sequência de nucleotídeo menor que 76% de identidade, e diferenças no sítio de clivagem da poliproteína), gama de hospedeiros, patogenicidade, citopatologia, o modo de transmissão e as diferenças sorológicas (ADAMS et al., 2011).

Os métodos sorológicos constituem a ferramenta mais comumente utilizada para a detecção de vírus de plantas, permitindo a diagnose rápida e simples da grande maioria dos vírus. Entretanto a sorologia tem provado não ser satisfatória quando aplicada à família *Potyviridae*. A relação sorológica entre os membros da família *Potyviridae* é extremamente complexa e inconsistente. A presença de reação cruzada variável entre anti-soros produzidos em diferentes laboratórios para um mesmo vírus; relação sorológica entre distintas espécies, isto é, anti-soro produzido contra uma espécie apresenta reação positiva com outras espécies diferentes; e a variação na reação cruzada entre estirpes de um mesmo vírus, são os maiores problemas associados a sorologia de *Potyvirus*. A partir destes estudos, ficou evidente a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas para a detecção precisa e identificação de espécies virais do gênero *Potyvirus* (SHUKLA et al., 1992).

Com o advento da Biologia Molecular, os estudos de taxonomia de vírus aprimoraram. A disponibilidade da obtenção de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos e a possibilidade de manipulação dessas sequências por meio da tecnologia do DNA recombinante, abriu novas portas para o entendimento das funções de proteínas

virais, bem como, a replicação viral, movimento viral, sintomatologia e o processo de infecção, possibilitando assim, o desenvolvimento de métodos de controle eficientes.

4. *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV)

Originalmente descrito por TAYLOR e PARES (1968) como *Maize Dwarf Mosaic Virus* e posteriormente por TEAKLE e GRYLLS (1973) como a estirpe *Johnsongrass* de *Sugarcane mosaic virus*, baseado somente com as propriedades biológicas e sorológicas. SHUKLA e RAJ (1987) demonstraram com base na sequência de nucleotídeo e aminoácidos da capa protéica, que este vírus pertence à família *Potyviridae*, do gênero *Potyvirus*, sendo posteriormente reclassificado como *Johnsongrass mosaic virus*.

Johnsongrass mosaic virus (JGMV) causa sintomas de mosaico em milho, sorgo e outras espécies de gramíneas na Austrália e nos Estados Unidos, resultando muitas vezes em significativas perdas econômicas. Esse vírus já foi descrito infectando naturalmente plantas de sorgo (*Sorghum* sp.) na Nigéria (isolado JGMV-N) (SEIFERS et al., 2004), milheto (*Pennisetum glaucum*) e milho (*Zea mays*) na Austrália no Estado do Queensland (isolado JGMV-Jg) (KARAN et al., 1992; GOUGH e SHUKLA, 1993), milho na Venezuela (MARIÑO et al., 2009), *Brachiaria* (isolado JGMV-Brac) na Colômbia (MORALES et al., 1996) e nos Estados Unidos já foi encontrado infectando aveia (*Avena* sp.) (JGMV-MDO) e milho no estado do Texas (isolado JGMV-KS1) (MCDANIEL e GORDON, 1989). No Brasil, este vírus foi recentemente relatado pelo nosso grupo de pesquisa em plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (isolado JGMV-Penni) na Bahia (SILVA et al., 2013).

O genoma completo de *Johnsongrass mosaic virus* foi caracterizado pela primeira vez por GOUGH e SHUKLA (1993). O primeiro isolado descrito foi o JGMV-JG, originário da Austrália. Seu genoma possui 9.766 nucleotídeos, excluindo a cauda poli A, e codifica uma poliproteína com 3.052 aminoácidos. A ORF é flanqueada por uma região 5'UTR com 135 nucleotídeos, e uma região 3'UTR com 475 nucleotídeos. A comparação da poliproteína do JGMV com sequências de outros membros do gênero *Potyvirus* permitiu a identificação dos sítios de clivagem da poliproteína. Esta identificação demonstrou que o JGMV possui genoma similar com outros membros do gênero *Potyvirus*. As proteínas P1 e P3 do JGMV são as mais variáveis e a proteína N1b é a mais conservada, quando

comparadas com as proteínas correspondentes de outros *Potyvirus*. O JGMV difere de outros membros do gênero *Potyvirus* no aminoácido da posição 1 do sítio de clivagem da proteína NIa-pro. O sítio de clivagem das proteínas P3/CI, CI/NIa, NIa/NIB e NIa-VPg/NIa-Pro contém um glutamato da posição 1 a qual é glutamina na maioria dos *Potyvirus*. Glutamato na posição 1 também já foi observado nas junções de CI/NIa-VPg de *Pea seed borne mosaic virus* e *Turnip mosaic virus*, e na junção de NIB/CP de *Papaya ringspot virus* (GOUGH e SHUKLA, 1993).

Plantas de sorgo são normalmente suscetíveis a JGMV. Entretanto, a cultivar de sorgo denominada Krish possui um gene de resistência de mesmo nome que confere resistência a esses vírus. Por outro lado, o isolado de JGMV-KS1, originário dos Estados Unidos, é capaz de infectar plantas de sorgo da cultivar Krish. Tal isolado JGMV-KS1 foi caracterizado baseado na sequência da Capa Proteica (CP). No entanto, ao comparar a sequência da CP do isolado JGMV-KS1 com o JGMV-Jg, observou-se algumas mudanças na sequência de aminoácidos, tanto na extremidade N-terminal, quanto na parte central da CP. Alguns desses aminoácidos diferentes podem ser responsáveis pela quebra de resistência em sorgo que carregam o gene de resistência Krish (SURANTO et al., 1998).

O isolado de JGMV-N que infecta sorgo na Nigéria foi parcialmente caracterizado por SEIFERS et al. (2004), utilizando testes sorológicos, gama de hospedeiro e sequência da capa protéica. A gama de hospedeiro foi testada com os antissoros contra *Maize dwarf mosaic virus*, *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), *Sugarcane mosaic virus* strain-MDB, *Sorghum mosaic virus* e *Zea mosaic virus*. O isolado nigeriano infectou de forma suave plantas de Capim-Cevadinha (*Bromus inermis*), causou necrose em linhagens de Sorgo (*Sorghum bicolor* L.), Capim Mombaça (*Panicum maximum* Jacq) e *Setaria adhaerns*. Entretanto, não infectou Johnsongrass (*Sorghum halepense*), Trigo (*Triticum aestivum* L.) e Aveia (*Avena sativa*). A massa da capa protéica foi determinada por SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) e mostrou que a CP do vírus nigeriana é menor (3 kDa) do que a do JGMV-MDO dos Estados Unidos. A sequência de aminoácidos (aa) foi determinada por TOF-MS (Time-of-flight mass spectrometry). A análise da sequência de aminoácidos da CP mostrou que os resíduos 1-7 da sequência da CP foram idênticos aos do JGMV (GenBank # A27631), e os resíduos 57-293 foram quase idênticos aos resíduos 67-303 do mesmo JGMV, porém, a região intermediária da CP

apresentou diferenças significativas, incluindo uma deleção de 10 aa, indicando que o isolado JGMV-N é distinto dos já descritos (SEIFERS et al., 2004).

Na Venezuela, o vírus é comumente chamado de *Potyvirus del mosaico del pasto Johnson* (*Johnsongrass mosaic virus*) e foi encontrado infectando cultivares comerciais de milho. Com o objetivo de determinar a reação de suscetibilidade e grau de resistência ao JGMV, 16 cultivares comerciais procedentes de diferentes empresas produtoras de sementes foram inoculadas com o JGMV (MARIÑO et al., 2009). Assim, as plantas infectadas mostraram sintomas de mosaico com diferentes graus de intensidade, característicos da infecção viral. Das cultivares inoculadas, 6 apresentaram resistência e 10 apresentaram diferentes graus de suscetibilidade, dividindo essas 16 cultivares em três subgrupos dentro de um único grupo. O fato de terem encontrado cultivares de milho resistentes ao JGMV, com baixos índices da doença, e com período de incubação mais longo é de grande interesse para o país, pois do ponto de vista econômico, esse aspecto é importante, uma vez que os rendimentos estão diretamente relacionados com os valores do índice da doença (MARIÑO et al., 2009).

A sequência peptídica do JGMV apresenta os motivos MVWCIENG, QMKAAA e DAG característicos de vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus*. O motivo DAG indica que JGMV é transmitido por pulgões, pois este motivo é frequentemente associado à transmissão do vírus com tais vetores (RYBICKI e SHUKLA 1992). Quatro pulgões são responsáveis pela transmissão de JGMV: *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum maidis* (TEAKLE e GRYLLES, 1973).

A região N-terminal da CP de *Potyvirus* é altamente variável e tem sido responsável pela determinação da proteção cruzada, gama de hospedeiros e virulência de estirpes de *Potyvirus*. Da mesma forma a região N-terminal da CP é a região mais variável entre isolados de JGMV. Suspeita-se que as mutações no isolado JGMV-Jg da Austrália e em outros isolados já caracterizados foram determinantes para especificidade de hospedeiros (SURANTO et al., 1998).

5. Sequenciamento de alto desempenho (Next Generation Sequencing - NGS)

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de Sequenciamento de Alto Desempenho (Next Generation Sequencing - NGS) que começaram a ser comercializadas

em 2005, permitem a obtenção de um volume grande de sequências com alta velocidade e rendimento, em uma única corrida, a um custo relativamente baixo. A maior vantagem destas plataformas é a capacidade de determinar dados de sequências a partir de fragmentos de DNA de uma biblioteca, evitando a necessidade de clonagem em vetores plasmidiais para a aquisição da sequência (BARZON et al., 2013). Esta técnica tem contribuído significativamente para pesquisas em muitas áreas da ciência e estão sendo cada vez mais introduzidas em análises clínicas, com muitas aplicações no diagnóstico em genética humana, oncologia, e também em microbiologia e virologia (RADFORD et al., 2012).

NGS se refere à plataformas que produzem grandes quantidades de “reads” (leituras) de DNA com tamanho de 25 e 400 bp. Esses “reads” são menores que o sequenciamento tradicional, tendo em vista que o Sanger pode gerar reads com sequências de 300 a 750 bp. No entanto, recentemente as tecnologias de NGS tem avançado para a produção de reads maiores que 750 pb, mantendo o baixo custo (BARBA et al., 2014).

Diferentes métodos de NGS estão disponíveis comercialmente, e novas plataformas melhoradas estão constantemente sendo desenvolvidas. Estes métodos têm diferenças bioquímicas (METZKER, 2010), diferem em protocolos de sequenciamento, rendimento e tamanho de sequências produzidas (BARZON et al., 2011), o que demanda também novas e variadas ferramentas de bioinformática. Assim, a plataforma SOLid system (Life Technologies), que caracteriza-se por possuir um alto rendimento, mas gera pequenos reads, talvez seja mais adequada para aplicações tais como grandes projetos de sequenciamento de genoma grandes ou projetos de sequenciamento de RNA. Em contrapartida, outras plataformas, como o 454 (Roche Diagnostics), Ion Torrent (Life Technologies) e Illumina podem fornecer dados adequados para montagem *de novo*. Apesar do rendimento limitado das plataformas 454 e Ion Torrent PGM, estes sequenciadores restringem sua aplicação a pequenas bactérias e para genomas virais. Em contraste, reads longos são gerados pelo 454 FLX (e sua versão menor GS Junior), que permite o sequenciamento de amplicons maiores, com aplicações em metagenômica de microrganismos, análise de quase-espécies virais e reconstrução de haplótipos virais (ZAGORDI et al., 2012). Os fatores mais importantes na seleção de uma plataforma de sequenciamento incluem o tamanho do genoma esperado a ser estudado, a sua

complexidade (incluindo o teor de G + C), e a profundidade da cobertura e precisão necessária (BARBA et al., 2014).

A característica mais comum da tecnologia NGS é o alto rendimento de dados gerados. Isso foi obtido pela alta acurácia, qualidade e tamanho médio das sequências produzidas, no entanto, ainda são mais baixos que os obtidos pelo sequenciamento Sanger. Como resultado, novos avanços estão sendo incorporados, a fim de explorar todo o potencial desses novos instrumentos: primeiramente, os passos para a análise de dados consumiam muito tempo e portanto, novas ferramentas para a análise dos reads estão sendo projetados, o que requer uma quantidade competente de mão de obra e experiência em bioinformática. Em segundo lugar, são necessárias para lidar com os dados produzidos, recursos computacionais adequados, especialmente quando eles são aplicados em testes de diagnóstico (BARZON et al., 2013).

As funções dos programas para a análise de dados do NGS podem ser classificadas em quatro categorias que incluem alinhamento de sequência dos reads, detecção de polimorfismo, montagem de genomas e anotação gênica. Vários pacotes de programas têm sido desenvolvidos para cada categoria de NGS. A aplicação prática de ferramentas de programas para a montagem de genoma já foi descrita por ZHANG et al., (2011). Novas categorias e novas ferramentas de programa para análise de sequenciamento de pequenos reads estão sendo continuamente desenvolvidos comercialmente em todo o mundo, especialmente nos EUA, Europa e Austrália. Muitas empresas comerciais de sequenciamento como a Roche, a Illumina e a SOLiD oferecem seus serviços de bioinformática para diferentes tipos de análise de sequenciamento de DNA ou RNA (BARBA et al., 2014).

Até o momento, a aplicação biológica para o NGS está direcionada primeiramente ao sequenciamento de genomas completos de organismos, tais como os de seres humanos, primatas, cães, gatos, ratos, nematoides, fungos, bactérias, vírus, entre outros. Em metagenômica a aplicabilidade desta técnica está no estudo das comunidades de microrganismos diretamente em seus ambientes naturais, sem no entanto a necessidade de isolamento dos mesmos em meio de cultivo. O objetivo desta abordagem está na caracterização de organismos presentes em uma amostra e identificar quais os papéis de cada organismo dentro de um ambiente natural específico (BARBA et al., 2014).

Para o estudo de transcriptomas, a aplicação da técnica inclui a análise e o sequenciamento completo de mRNA e de sRNA, análise da expressão de transcritos de mRNA, quantificação da expressão de genes, anotação de transcritos, descoberta de SNPs ou mutação somática e sequenciamento de cDNAs de variados RNAs (RNA genômico, mRNA, micro RNA, RNA ribossomal) (WANG et al., 2009).

O sequenciamento de amplicons é o método que permite a detecção de frequências de mutações em níveis extremamente baixos no DNA alvo quando amplificado por PCR em regiões específicas. Essa técnica tem sido usada para identificar baixa frequência de mutações somáticas em amostras de câncer, descoberta de variantes raras em pacientes infectados por HIV, entre outros. Recentemente, também tem sido usado para sequenciamento de fitoplasmas em videiras (BARBA et al., 2014).

6. Sequenciamento de alto desempenho aplicada a virologia de planta

A tecnologia do NGS combinada com análise de bioinformática sofisticada alterou recentemente o campo da virologia de planta, principalmente nas áreas de sequenciamento de genomas, ecologia, descobertas de novas espécies e gêneros de vírus, epidemiologia, transcriptomas, replicação, detecção e identificação. Atualmente, um pequeno número de vírus de planta de RNA e viróides foram identificados a partir de plantas infectadas e sequenciadas por RNA-seq (BARBA et al., 2014).

A detecção e identificação de novos vírus atualmente contam com uma grande variedade de técnicas, tanto tradicionais como modernas. Tradicionalmente, o processo para a identificação de vírus inicia-se com a observação por microscopia eletrônica e inoculação de plantas hospedeiras. Subsequentemente, teste específicos, como os sorológicos (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay) e testes moleculares (PCR-Reação em cadeia da polimerase, hibridização de ácido nucléico) são empregados para a melhor identificação e caracterização de espécies virais (GIBBS e MACKENZIE, 1997; JAMES et al., 2006). Mais recentemente, as técnicas de microarranjo foram desenvolvidas, e oferecem mais flexibilidade para a detecção viral, permitindo que um grande número de agentes patogênicos alvos sejam testados simultaneamente (BOONHAM et al., 2007). Embora bem sucedidas, estas técnicas apresentam algumas inconveniências, especialmente quando se tenta identificar patógenos desconhecidos. Em primeiro lugar, os ensaios

específicos requerem uma predição do agente infeccioso. No entanto, estes dados são frequentemente incompletos ou até mesmo totalmente ausentes. Em segundo lugar, testes específicos, incluindo microarranjos utilizam primers, sondas e anticorpos capazes de detectar apenas uma estirpe viral em particular, espécie individual ou um pequeno grupo de patógenos, sendo assim, incapazes de detectar novas variantes que possam surgir. Em terceiro lugar, métodos não específicos, como microscopia eletrônica e inoculação de plantas hospedeiras podem ser úteis para a identificação do gênero ou família de vírus. No entanto, outras técnicas são necessárias para alcançar uma identificação precisa (ADAMS et al., 2009). Com o advento do NGS, com alta escala de sequenciamento e baixo custo, se permitiu o estudo de metagenômica e a identificação de novas doenças de forma rápida, e esta técnica vem se consolidando como um método popular para a obtenção de genomas completos de vírus de planta (QUAN et al., 2008). A metagenômica, como uma ferramenta para diagnóstico de vírus de planta, oferece a possibilidade de superar os problemas como erros na detecção de patógenos associados a inespecificidade de técnicas de detecção tradicionais (ADAMS et al., 2009).

Os vírus de RNA possuem genomas pequenos e simples e tem um alto nível de diversidade devido à baixa fidelidade da polimerase viral utilizada na replicação. Tradicionalmente, devido aos genomas virais pequenos, a técnica de “*genome walking*” é utilizada para a obtenção de sequências completas de vírus a partir de desenhos sucessivos de primers (MARSTON et al., 2007). Apesar de importante, esta metodologia demanda tempo, esforço, e pode ser dificultada, devido à variação dentro de cada espécie de vírus, o que resulta na necessidade de reformulação dos pares de primers e frequente re-otimização das condições de PCR (MARSTON et al., 2013). A introdução de erros por PCR utilizando sequenciamento baseado em Sanger também é problemático, especialmente, quando o sequenciamento é de DNA clonado. O uso de enzimas com alta fidelidade e o sequenciamento de produtos de PCR podem resolver essa questão, porém, erros que ocorrem no processo de amplificação serão sequenciados incorretamente (BRACHO et al., 1998). Este problema pode ser evitado utilizando plataformas de sequenciamento de nova geração, que geraram milhões de sequências, permitindo assim, à obtenção de sequências completas de vírus. As vantagens das tecnologias NGS em virologia são numerosas, e seu uso está se tornando mais comum, (RADFORD et al., 2012) particularmente para detectar e

caracterizar patógenos sem o conhecimento prévio de sua existência, e sem o requisito de primers específicos (WU et al., 2012).

O NGS também está sendo utilizado para a identificação de vírus a partir de RNA interferente. Em resposta à infecção viral, tanto por vírus de RNA quanto por vírus de DNA ou viróides, as plantas hospedeiras geram moléculas de RNA específicas, de 21 a 24 nt chamados de RNAs interferentes (siRNA). Silenciamento gênico ou interferência mediada por RNA (RNAi) é um sistema de resposta da planta a infecção viral, no qual ocorre o reconhecimento de RNAs fita dupla (dsRNA) e especificamente destrói moléculas de RNA de cadeia simples e duplas homólogas ao indutor, usando pequenos RNAs interferentes como um guia (BARZON et al., 2011; BARBA e HADIDI, 2009). O NGS de siRNA oferece a oportunidade de identificação de vírus que infectam planta, até mesmo em baixa acumulação viral, em infecções assintomáticas, incluindo vírus desconhecidos. O sequenciamento de nova geração fornece milhões de sequências de siRNA de vírus, e quando essas sequências são suficientemente abundantes, os fragmentos de vírus gerados podem ser agrupados, possibilitando a montagem completa do genoma de um vírus. Além de plantas, essas tecnologias também têm sido utilizadas para a detecção e identificação de vírus em insetos vetores (LIU et al., 2011).

O uso recente de tecnologias NGS em virologia vegetal revelou que algumas doenças de etiologia desconhecida que afetam diversas plantas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas, são causadas por vírus novos ou já conhecidos, porém, ainda pouco caracterizados. Sequenciamento de alto desempenho tem se mostrado uma boa opção para a investigação de doenças de etiologia desconhecida (HOWELL et al., 2011).

Desde 2009, as tecnologias NGS combinadas com bioinformática sofisticada, foram utilizadas com sucesso em virologia de planta. O conhecimento de novos vírus tanto de RNA, quanto de DNA e seus vírus satélites de diferentes espécies que infectam plantas, foram estudados com sucesso usando essas tecnologias. O número de publicações, no entanto, ainda é pequeno. A utilização do NGS em virologia vegetal em um futuro próximo certamente aumentará, seja na pesquisa ou no diagnóstico de vírus. O potencial de uso dessas tecnologias em programas de certificação de plantas e de quarentena pode efetivamente melhorar a eficiência e confiabilidade dos programas, principalmente no

controle de vírus e doenças virais, tanto a nível nacional como internacional (BARBA et al., 2014).

7. Referências bibliográficas

- ABIEC. Brasil lidera ranking de exportação de carne bovina [online]. Disponível em: http://www.abiec.com.br/news_view.asp?id=%7BCAACE975-B5D1-4337-9F3B580E7118CB45%7D, [Acesso 29 ago 2013], 2009.
- ADAMS, I. P.; GLOVER, R. H.; MONGER, W. A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Mol. Plant. Pathol*, v. 10, p. 537-545, 2009.
- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch. Virol.*, v. 150, p. 459-479, 2005.
- ADAMS, M. J.; ZERBINI, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. Virus Taxonomy. Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. New York: *Academic Press*, 1327 p., 2011.
- ALFENAS-ZERBINI, P.; MAIA, I. G.; FAVARO, R. D.; CASCARDO, J. C. M.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; ZERBINI, F. M. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a *Potyvirus*. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 22, p. 352-361, 2009.
- ANDRADE, C. M. S.; VALENTIM, J. F. Recuperação da capacidade produtiva de uma pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com adubação nitrogenada ou fosfatada. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA (CD-ROM). Campo Grande. Anais. Campo Grande: SBZ/ Embrapa Gado de Corte, 2004.
- ANDRADE, R. P. Pasture seed production technology in Brasil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS. São Pedro. Proceedings. FEALQ. Piracicacaba, p. 129-132, 2001.

- ARANOVICH, S. O capim colônião e outras cultivares de *Panicum maximum* Jacq.: Introdução e evolução do uso no Brasil. In: Simpósio sobre Manejo da Pastagem, 12, Piracicaba. Anais. FEALQ. Piracicaba. p.1-20, 1995.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoria Genética de Plantas Forrageiras Tropicais no Brasil. *Arch. Zootec*, v. 57 (R): p. 61-76, 2008.
- BARBA, M.; HADIDI, A. RNA silencing and viroids. *J. Plant. Pathol.* v. 91, p. 243-247, 2009.
- BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*, v. 6, p. 106-136, 2014.
- BARZON, L.; LAVEZZO, E.; MILITELLO, V.; TOPPO, S.; PALÙ, G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 12, p. 7861-7884, 2011.
- BARZON, L.; LAVEZZO, E.; COSTANZI, G.; FRANCHIN, E.; TOPPO, S.; PALÙ, G. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology, *Journal of Clinical Virology*, v. 58, p. 346-350, 2013.
- BENNET, H. W. Pasto Johnson, pasto alfombra y otras gramíneas para el sur húmedo de los Estados Unidos. In: HUGUES, H. D. *et al.* (Ed.). Forrajes. México: C.E.C.S.A., cap. 29, p. 321-334, 1976.
- BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. A. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopath.*, v. 45, p. 307-328, 2007.
- BRACHO, M. A.; MOYA, A.; BARRIO, E. Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *J Gen Virol*, v. 79, n. 12, p. 2921-2928, 1998.
- BRUNKEN, J. N. A systematic study of *Pennisetum* Sect. *Pennisetum* (Gramínea). *Am. J. Bot.*, v. 64, p. 161-176, 1977.
- CARVALHO, L. A. *Pennisetum purpureum*, Schumacher-Revisão. EMBRAPA-CNPGL. Coronel Pacheco. 86 p. (EMBRAPA CNPGL. Boletim de Pesquisa), 10, 1985.
- COMBES, D.; PÉRNES, J. Variation dans les nombres chromosomiques du *Panicum maximum* en relation avec le mode de reproduction. *Comptes Rendues Academie Science*, v. 270, p.782-785, 1970.

- DALEY, C. A.; ABBOTT, A.; DOYLE, P. S.; NADER, G. A.; LARSON, S. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition Journal*, v. 9, n. 10, 2010.
- DIAS-FILHO, M. B. Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação. 4. ed. rev. Belém, PA, 2011.
- DIAS-FILHO, M. B. Diagnóstico das Pastagens no Brasil. Embrapa Amazônia Oriental. ISSN 1983-0513, 2014.
- DIAS-FILHO, M. B.; ANDRADE, C. M. S. Pastagens no trópico úmido. Documentos 241, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1517-2201, 2006.
- EDWARDSON, J. R. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *American Journal Botany*, v. 53, p. 359-364, 1966.
- ELENA, S. F; RODRIGO, G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Curr Opin Virol*, v. 2, p. 719-724, 2012.
- FAO. The state of food and agriculture. [online]. Disponível em: <http://bit.ly/dcsAFD> [Acesso 25 jul 2013], 2009.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Eds). Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: *Academic Press*. 1259 p. 2005.
- FERRAZ, J. B. S; FELÍCIO, P. E. D. Production systems - an example from Brazil. *Meat Science*, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.
- GAL-ON, A.; ANTIGNUS, Y.; ROSNER, A.; RACCAH, B. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 2183-2187, 1992.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, v. 63, p. 9-16, 1997.
- GOUGH, K. H.; SHUKLA, D. D. Nucleotide sequence of Johnsongrass mosaic *Potyvirus* genomic RNA. *Intervirology*, v. 36, p.181-192, 1993.
- GUO, D.; MERITS, A.; SAARMA, M. Self-association and mapping of interaction domains of helper component proteinase of potato A potyvirus. *J. Gen. Virol.*, v. 80, p. 1127-1131, 1999.

- HACKER, J. B.; JANK, L. Breeding tropical and subtropical grasses. In: CHERNEY, J.H; CHERNEY, D.J.R; ed. Grass for dairy cattle. Cambridge: CABI Publishing, p. 49-72, 1998.
- HAJIMORAD, M. R.; DING, X. S.; FLASINSKI, S.; MAHAJAN, S.; GRAFF, E.; HALDEMAN-CAHILL, R.; CARRINGTON, J. C.; CASSIDY, B. G. NIa and NIb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. *Virology*, v. 224, p. 368-379, 1996.
- HALGREN, A.; TZANETAKIS, I. E.; MARTIN, R. R. Identification, characterization, and detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*, v. 97, p. 44-50, 2007.
- HERLING, V. R.; BRAGA, G. J.; LUZ, P. H. C.; OTANI, E. L. Tobiata, Tanzânia e Mombaça. In: Simpósio sobre Manejo da Pastagem, 17, Piracicaba. Anais. FEALQ. Piracicaba. p. 89-132, 2001.
- HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. *Potviruses*. In: Kurstak, E. Hand-book of plant virus infections comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland, p. 731-807. 1981.
- HOWELL, W. E.; THOMPSON, D.; SCOTT, S. Virus-like disorders of fruit trees with undetermined etiology. In *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*; HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, W.; Eds; The American Phytopathological Society Press: St. Paul, MN, USA, p. 259-265, 2011.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [online]. Produção da Pecuária Municipal. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. [Acesso 05 Jan 2014], 2007.
- ICTV 2011. International Committee on Taxonomy of Virus [online]. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> [Acesso em 25 jun 2014].
- JAMES, D.; VARGA, A.; PALLAS, V.; CANDRESSE, T. Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. *Can. J. Plant Pathol.*, v. 28, p. 16-29, 2006.
- JANK, L.; COSTA, J. C. G; SAVIDAN, Y. H; VALLE, C. B. do. New *Panicum maximum* cultivars for diverse ecosystems in Brazil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS. Palmerston North. Proceedings: New Zeland Grassland Association, p. 509-551, 1993.
- JANK, L.; SAVIDAN, Y. H.; SOUZA, M. T. de; COSTA, J. C. G. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzido da África: 1. Produção forrageira. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 23, n. 3, p. 433-440, 1994.

- JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., Piracicaba. Anais. Piracicaba: FEALQ, p. 21-58, 1995.
- JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; CALIXTO, S.; GONTIJO-NETO, M. M.; LAURA, V. A.; MACEDO, M. C. M; VALLE, C. B. Preliminary performance of *Panicum maximum* accessions and hybrids in Brazil. In: XX INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, Dublin. Proceedings. Wageningen Academic Publishers: The Netherlands, p. 109, 2005.
- JANK, L.; RESENDE, R. M. S; VALLE, C. B. do. Melhoramento genético de *Panicum maximum*. In: RESENDE, R. M. S; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Ed.) Melhoramento de forrageiras tropicais. 1.ed. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, p. 55-87. 2008.
- KARAN, M.; NOONE, D. F.; TEAKLEAD, D. S.; HACKER, J. B. Susceptibility of pearl millet accessions and cultivars to Johnsongrass mosaic and sugarcane mosaic viruses in Queensland., *Australasian Plant Pathology*, v. 21, 1992.
- KING, A. M. Q; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, J. M.; CARSTENS, E. B. Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1327 p., 2012.
- KNUHTSEN, H.; HIEBERT, E.; PURCIFULL, D. E. Partial purification and some properties of Tobacco etch virus induce intanuclear inclusions. *Virology*, v. 61, p. 200-209, 1974.
- LAPIERRE, A.; SIGNORET, P. A. Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Gramineae). Science Pub Inc. illustrated edition, December 30. 852 p., 2004.
- LIU, S.; VIJAYENDRAN, D.; BONNING, B. C. Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. *Viruses*, v. 3, p. 1849-1860, 2011.
- MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: BARBOSA, R. A. (Org.). Morte de pastos de braquiárias. Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte., p. 36-65, 2006.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [online]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2013/02/pecuaria-brasileira-reduz-area-e-dobra-producao-em-36-anos> [Acesso 04 dez 2013], 2013.

- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [online]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao> [Acesso 10 jan 2014], 2014.
- MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R. Doenças em plantas forrageiras. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, *ISSN 1983-974*, 2011.
- MARIÑO, A. A.; GARRIDO, M. J.; ASCANIO, A. Reaccoín de cultivares de maíz al *Potyvirus* del mosaic del pasto Johnson. *Fitopatologia Venezuela*, v. 35, 2009.
- MARSTON, D. A.; MCELHINNE, Y.; JOHNSON, N.; MULLER, T.; CONZEL, M.; ANN, K.K.; TORDO, N.; FOOKS, A. R. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *J Gen Virol*, v. 88, p. 1302-1314, 2007.
- MARSTON, D. A.; MCELHINNEY, L. M.; ELLIS, R. J.; HORTON, D. L.; WISE, E. L.; LEECH, S. L.; DAVID, D.; LAMBALLERIE, X.; FOOKS, A. R. Next generation sequencing of viral RNA Genomes. *BMC Genomics*, v. 14, p. 444, 2013.
- MCDANIEL, L. L.; GORDON, D.T. Identification of a new strain of maize dwarf mosaic virus. *Plant Dis*, v. 69, p. 602-607, 1985.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies-The next generation. *Nat. Rev. Genet.*, v. 11, p. 31-46, 2010.
- MORALES, F. J.; OSPINA, M. D.; CASTAÑO, M.; CALVERTLA, T. Sequence analysis of the genomic RNA3 terminal region of a *Potyvirus* from *Brachiaria* spp. related to *Guineagrass mosaic virus*. *J Phytopathol*, v. 144, p. 485-489, 1996.
- OTERO, J. R. Informações sobre algumas plantas forrageiras. 2.ed. Rio de Janeiro: SAI, 1961.
- PAP. Plano Agrícola e Pecuário 2013/2014. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola [online]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> [Acesso 03 abril 2014], 2013.
- PARSONS, J. J. Spread of African grasses to the American Tropics. *J. Range Manage.*, v. 25, p. 12-17, 1972.
- PEREIRA, A. V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante. In: Simpósio sobre Capim-Elefante, 2., Juiz de Fora. Anais. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL. p. 1-11, 1994.

- PRASCH, C. M.; SONNEWALD, U. Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiol*, v. 162, p. 1849-1866, 2013.
- QUAN, P.; BRIESE, T.; PALACIOS, G.; LIPKIN, W. I. Rapid sequence-based diagnosis of viral infection. *Antiviral Res.*, v. 79, p.1-5, 2008.
- RADFORD, A. D.; CHAPMAN, D.; DIXON, L.; CHANTREY, J.; DARBY, A. C.; HALL, N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol*, v. 93, p.1853-1868, 2012.
- RIEDEL, D.; LESEMANN, D. E.; MAISS, E. Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. *Arch. Virol.*, v. 143, p. 2133-2158, 1998.
- RYBICKI, E. P.; SHUKLA, D. D. Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. In: Barnett OW(ed), Potyvirus taxonomy. *ArchVirol [Suppl 5]*: p.139-170, Springer, Wien NewYork, 1992.
- RODRIGUES, L. R. A., MONTEIRO, F.A. E; RODRIGUES, T. J. D. Capim elefante. In: Simpósio sobre Manejo de Pastagem, 17., 2001, Piracicaba. *Anais. FEALQ. Piracicaba.* p. 203-224, 2001.
- ROTT, M. E; JELKMANN, W. Little cherry virus-2: sequence and genomic organization of an unusual member of the Closteroviridae. *Arch. Virol.*, v. 150, p. 107-123, 2005.
- SANTOS, J. C. S.; SANTOS, R. L.; RABAIOLI, C. O.; SANTOS-GOUSSAIN, R. C.; DUARTE, T. F. Associação de fungos fitopatogênicos em sementes de pastagens do gênero *Brachiaria*. In: XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2007, Maringá-PR. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, 2007.
- SEIFERS, D. L.; HABER, S.; ENS, W.; SHE, Y-M.; STANDING, K. G.; SALOMON, R. Characterization of a distinct *Johnsongrass mosaic virus* strain isolated from sorghum in Nigeria. *Arch Virol*, 150: 557–576, 2004.
- SHUKLA, D. D; LAURICELLA, R; WARD, C. W. Serology of *Potyviruses*: current problems and some solutions. In: BARNETT, O. W. *Potyvirus Taxonomy*, Springer, Wien and New York. *Archives of Virology*, v. 5, p. 31-46. 1992.

- SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Identification and classification of *Potyvirus*es on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology*, v. 106, p. 171-200, 1989.
- SHUKLA, U. C.; RAJ, H. Relative response of corn (*Zea mays L.*), pearl-millet (*Pennisetum typhoides*). *J. Plant Nutr.*, v. 10, p. 2057-2067, 1987.
- SILVA, K. N.; NICOLINI, C.; SILVA, M. S.; FERNANDES, C. D.; NAGATA, T.; RESENDE, R. O. First Report Of *Johnsongrass Mosaic Virus* (JGMV) Infecting *Pennisetum purpureum* In Brazil. July, *Plant Disease*, v. 97, n. 7, p. 1003, 2013.
- SOUZA, A. G. Capim-elefante. In: Curso de atualização em pastagens. Cascavel. Anais. OCEPAR. Cascavel. p. 153-164, 1991.
- SOUZA, F. H. D.; POTT, E. B.; PRIMAVES, O. I.; BERNARDI, A. C. C.; RODRIGUES, A. Usos alternativos da palhada residual da produção de sementes para pastagens. 1ª ed. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos. SP. v. 1. 241 p., 2006.
- SURANTO, S.; GOUGH, K. H.; SHUKLA, D. D.; PALLAGHY, C. K. Coat protein sequence of Krish infecting strain of Johnsongrass mosaic *Potyvirus*. *Arch Virol*, v. 143, p. 1015-1020, 1998.
- SUSAIMUTHU, J.; TZANETAKIS, I. E.; GERGERICH, R. C.; MARTIN, R. R. A member of a new genus in the Potyviridae infects *Rubus*. *Virus Research*, v. 131, p. 145-150, 2008.
- TATINENI, S.; ZIEMS, A. D.; WEGULO, S. N.; FRENCH, R. Triticum mosaic virus: a distinct member of the family potyviridae with an unusually long leader sequence. *Phytopathology*, v. 99, n. 8, p. 943-950, 2009.
- TAYLOR, R. H.; PARES, R. D. The relationship between sugarcane mosaic virus and mosaic virus maize and Johnson grass in Australia. *Aust. J. agric. Res.*, v. 19, p. 767, 1968.
- TCACENCO, F. A.; BOTREL, M. A. Identificação e avaliação de acessos e cultivares de capim elefante. In: M.M. CARVALHO, M.J.ALVIM, D.F. XAVIER, L. DE A. CARVALHO (eds.). Capim-elefante: produção e utilização. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco, p. 1-30. 1994.
- TEAKLE, D. S.; GRYLLS, N. E. Four strains of sugarcane mosaic virus infecting cereals and other grasses in Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 24, p. 465-477, 1973.

- URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. *Potyvirus* protein: a wealth functions. *Virus Research*, v. 74, p. 157-175, 2001.
- VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B; MACEDO, M. C. M; VALÉRIO, J. R; CALIXTO, S. Selecting new *Brachiaria* for Brazilian pastures. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, Anais. São Pedro: FEALQ. CD-ROM. ID. 13-14, 2001.
- VALLI, A.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of *Cucumber vein yellowing Ipomovirus*, a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HC Pro. *J. Virol.*, v. 80, p. 10055-10063, 2006.
- VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. Doenças em forrageiras [online]. Campo Grande, MS, Embrapa Gado de Corte, ISSN 1516-5558. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD50.html> [Acesso 23 mar 2014], 2001.
- VIRALZONE.[online]. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/294.html [Acesso 10 abr 2014], 2014.
- WANG, Z; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, v. 10, p. 57-63, 2009.
- WU, Q.; WANG, Y.; CAO, M.; PANTALEO, V.; BURGYN, J.; LI, W. X.; DING, S. W. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by Deep sequencing and a new computational algorithm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 109, p. 3938-3943, 2012.
- YANG, C.; GUO, R.; JIE, F.; NETTLETON, D.; PENG, J.; CARR, T.; YEAKLEY, J. M.; FAN, J. B.; WHITHAM, S. A. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 20, p. 358-370, 2007.
- ZAGORDI, O.; DÄUMER, M.; BEISEL, C.; BEERENWINKEL, N. Read length versus depth of coverage for viral quasispecies reconstruction. *PLoS ONE*, v.7:e47046.6, 2012.
- ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics*, v. 38, 95e109. 2011.

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Johnsongrass mosaic virus* EM PLANTAS FORRAGEIRAS DOS GÊNEROS *Brachiaria*, *Panicum*. E *Pennisetum*

1. Introdução

Plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*, pertencem a família *Poaceae*, são originárias do continente Africano e, atualmente, essas gramíneas forrageiras têm contribuído decisivamente para o desenvolvimento da bovinocultura nacional fazendo do Brasil o segundo maior produtor e maior exportador mundial de carne bovina (ABIEC, 2009).

O conhecimento sobre os agentes etiológicos de doenças virais, principalmente aqueles que afetam a produtividade das pastagens, ainda é limitado. Com isso há dificuldades no estabelecimento de medidas específicas para o manejo de doenças em plantas forrageiras e na geração de material resistente (MARCHI et al., 2011).

Os vírus vegetais representam um sério problema para a agricultura, podendo se tornar um fator limitante para o desenvolvimento de determinadas espécies vegetais. Medidas de controle como a eliminação dos vetores, o uso de material sadio, a rotação de culturas e a erradicação de plantas infectadas são apenas soluções temporárias (HULL, 2002). A estratégia mais eficiente de controle envolve o uso de cultivares melhoradas para resistência ao vírus ou ao seu vetor (MENG e GUBBA, 2000).

Visitas realizadas ao banco de germoplasma de plantas de *Panicum* e *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte no ano de 2013 revelaram uma alta incidência de sintomas característicos de mosaico, que aparentavam ser causados por vírus. Devido à alta frequência e severidade de doenças viróticas observadas em plantas forrageiras no campo, aliada a completa falta de conhecimento científico, houve a necessidade de estudo mais aprofundado destes vírus, pois o conhecimento sobre os agentes etiológicos de doenças virais e os danos causados por esses vírus em plantas forrageiras ainda são desconhecidos no Brasil (MARCHI et al., 2011).

A detecção e identificação de novos vírus atualmente contam com uma grande variedade de técnicas, tanto tradicionais como modernas. Atualmente, as plataformas de sequenciamento de alto desempenho vêm se tornando um método prático e rápido para a

obtenção de genomas virais completos, em um período de tempo relativamente curto. A tecnologia do NGS combinada com análise de bioinformática alterou recentemente o campo da virologia de plantas, principalmente na área de sequenciamento de genomas completos (LIU et al., 2011). O uso recente de tecnologias NGS em virologia vegetal revelou que algumas doenças de etiologia desconhecida, que afetam diversas plantas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas, são causadas por vírus não descritos ou pouco conhecidas. As plataformas de sequenciamento de alto desempenho têm se mostrado uma boa opção para a investigação de doenças de etiologia desconhecida (HOWELL et al., 2011).

Estudos preliminares de microscopia eletrônica evidenciaram a presença de vírus com partículas semelhantes à de *Potyvirus*. No ano de 2013, foi publicado pelo nosso grupo de pesquisa o primeiro relato de *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) infectando *Pennisetum purpureum* (SILVA et al., 2013), sendo a caracterização do genoma completo deste vírus tema deste trabalho.

Johnsongrass mosaic virus (JGMV) causa sintomas de mosaico em milho na Venezuela (MARIÑO et al., 2009), na Austrália (GOUGH e SHUKLA, 1993; KARAN et al., 1992), nos Estados Unidos (SURANTO et al., 1998) sorgo na Nigéria (SEIFERS et al., 2004), em *Brachiaria* na Colômbia (MORALES et al., 1996). Este vírus pertence à família *Potyviridae* e gênero *Potyvirus*, sendo transmitido por pulgões da espécie *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum maidis* (TEAKLE e GRYLLES, 1973). Porém no Brasil, pouco se conhece sobre a disseminação e diversidade deste vírus em plantas forrageiras ou outros cultivos economicamente importantes.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar moleculamente isolados de *Johnsongrass mosaic virus* que foram encontrados infectando plantas do gênero *Brachiaria* e *Panicum* denominados aqui de isolado JGMV-BR e infectando plantas de *P. purpureum* denominados de isolado JGMV-Penni utilizando a plataforma de sequenciamento de alto desempenho.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção dos isolados de JGMV

Folhas de *Panicum*, *Brachiaria*. e *P. purpureum* com sintomas de vírus foram coletadas na Embrapa Gado de Corte, no Estado do Mato Grosso do Sul, em Março de 2013, e na Embrapa Gado de Leite, no Estado da Bahia no ano de 2009. As plantas sintomáticas coletadas fazem parte do programa de melhoramento de plantas forrageiras da Embrapa. A Figura 2.1, demonstra os sintomas observados em campos de melhoramento genético de *Panicum*., *Brachiaria* e *P. purpureum*.

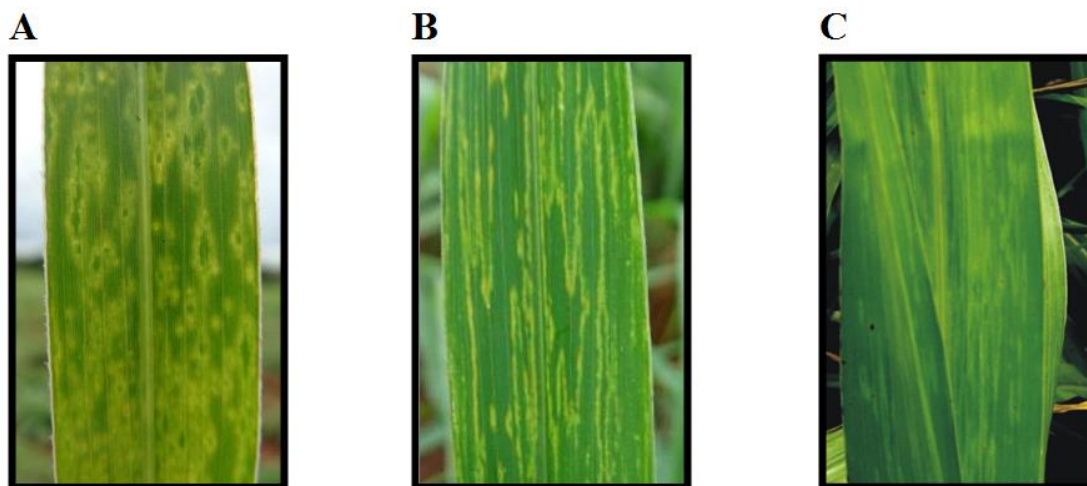


Figura 2.1: Sintomas de infecção por vírus observados em bancos ativos de germoplasma da Embrapa. (A) BB- B138 com sintomas de mosaico e anéis em campos da Embrapa Gado de Corte; (B) PM-19/2004 com sintomas de mosaico em campos da Embrapa Gado de Corte; (C) PP- 211 com sintomas de mosaico em campos experimentais da Embrapa Gado de Leite.

2.2. Microscopia eletrônica

A observação da partícula viral foi realizada utilizando o método *leaf dip*. Folhas de *P. purpureum* CNPGL 00211 com sintomas de infecções por vírus foram cortadas em pequenos pedaços e maceradas em 50 µl de ácido fosfotúngstico (PTA) formando uma gota. Em seguida, duas telas de cobre recobertas com Formvar/carbono foram colocadas

sobre esta gota e deixadas por um minuto, posteriormente, as telas foram removidas e secas com auxílio de um papel filtro para a visualização em microscópio eletrônico.

2.3. Purificação viral

A purificação foi realizada com o objetivo de isolar partículas virais com formato icosaédrico e flexuoso. Folhas de *Panicum maximum* (5 acessos), *P. purpureum* e *Brachiaria* (5 acessos), descritos na Tabela 2.1, foram maceradas com nitrogênio líquido, tampão fosfato 0,1 M e EDTA 1mM e 200 µl de β-mercaptoetanol, foi adicionado. Em seguida a amostra foi filtrada com gaze e centrifugada por 20 min a 5000 rpm (3.836 x g) em uma centrífuga preparativa. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para 2 tubos de ultracentrífuga e adicionou-se uma solução de sacarose 20% (20 ml) para a formação do colchão de sacarose que foi centrifugado a 33.000 x g por 2 h. Após a purificação da partícula viral, o RNA foi extraído com o kit RNeasy plant mini kit (Qiagen) seguindo o manual do fabricante. Após a extração do RNA, as amostras de *Panicum* e *Brachiaria* foram unidas formando uma amostra composta e enviadas para a o sequenciamento. A purificação da planta de *Pennisetum purpureum* com sintomas de vírus foi realização da mesma forma, porém separadamente das purificações realizadas para *Panicum* e *Brachiaria*. As plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho estão descritas na Tabela 2.1, e foi atribuído um código para cada planta, sendo estes utilizados nesta dissertação.

Tabela 2.1: Plantas utilizadas para o sequenciamento do genoma completo de *Johnsongrass mosaic virus*.

Nome original	Código
<i>Panicum maximum</i> Hugo Gen- 09/2013	PM-09/2013
<i>Panicum maximum</i> Hugo Gen-19/2004	PM-19/2004
<i>Panicum maximum</i> planta filha Hugo 207 PMI-14/207	PM-207
<i>Panicum maximum</i> PMI18/2009	PMI-18/2009
<i>Panicum maximum</i> híbrido H8	PM-H8

<i>Brachiaria humidicola</i> -H6	BH-H6
Híbrido de <i>Brachiaria</i> (Progenie de meio irmão de <i>B. ruziziensis</i>)	HB
<i>Brachiria decumbens</i> x <i>Brachiria decumbens</i> x <i>Brachiaria brizantha</i> x <i>Brachiaria ruziziensis</i> -híbrido sexual-S73=3022	B-S73=3022
<i>Brachiaria brizantha</i> B138	BB138
<i>Brachiaria</i> spp. híbrido meio-irmão-exp9 parc 836	B-836
<i>Pennisetum purpureum</i> Linhagem CNPGL 00211	PP-211

2.4. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática

As amostras de RNA originárias da purificação das amostras de *Panicum* e *Brachiaria* foram agrupadas formando uma amostra composta, que foi sequenciada na Macrogen INC. (Coréia), utilizando a tecnologia Illumina HiSeq 2000. A amostra de RNA extraída de *P. purpureum* CNPL 00211 foi sequenciada na Universidade Católica de Brasília (UCB), utilizando tecnologia Illumina MiSeq System.

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

A partir das sequências geradas, após a identificação do vírus *Johnsongrass mosaic virus* nas amostras sequenciadas, foram sintetizados *primers* específicos para a detecção do vírus nas plantas selecionadas para o estudo.

2.5. Detecção de JGMV por RT-PCR nas plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho

Inicialmente foi feito o diagnóstico em *P. purpureum* utilizando os *primers* universais para *Potyvirus* PY11 5' GGNAAYAAYAGYGGNCARCC 3' e M10 5'

AAGCAGTGGTATCAACGCAGA 3' (CHEN et al., 2001), pois essa foi a primeira detecção e identificação do JGMV em plantas forrageiras.

A partir do consenso de *contigs* do genoma viral obtido, o gene da CP foi analisado para desenho de *primers* específicos destinados ao diagnóstico de *Johnsongrass mosaic virus* por RT-PCR em *Panicum* spp. e *Brachiaria* spp. A fim de otimizar a PCR, ou seja, testar a especificidade dos *primers*, RNA total foi extraído de folhas de *P. purpureum* (100 mg), sabidamente infectado com JGMV, utilizando o reagente TRIzol ou Plant RNA Reagent (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa do kit SuperScript III (Invitrogen), a partir do *primer* reverso específico JG9,413-R 5' TTAGCCCCACGGTATGAATG 3'. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 5 µl de RNA total, 1 µl de dNTP, 1 µl do *primer* JG9,413-R e 5 µl de H₂O DEPC (Diethyl Pyrocarbonate), seguida de 5 min de incubação a temperatura de 65 °C para abrir a fita de RNA. Posteriormente foi adicionado 4 µl de 5X First-Strand Buffer, 2 µl de DTT, 1 µl da enzima SuperScript III e 1 µl de RNase out. A temperatura de incubação utilizada nesta etapa foi de 55 °C, seguida por um período de incubação de 70 °C por 15 min para a inativação da enzima.

A Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) foi utilizada para a realização da PCR, seguindo instruções do fabricante. Os *primers* específicos utilizados na RT-PCR foram: JG8,352-F 5' CAAAGCCCCATACTTGTCGG 3' e JG9,413-R. Para a reação de PCR utilizou-se 1 µl dos *primers* 10 µM JG8,352-F e JG9,413-R, 5 µl de 10X PCR Buffer, 1,5 µl de 50 mM MgCl₂, seguida de 1 µl de dNTP, 1 µl de Taq DNA Polymerase Platinum, 3 µl do cDNA e 36 µl de H₂O, para uma reação de final de 50 µl. As condições da PCR utilizadas nesta etapa estão descritas na Tabela 2.2.

Posteriormente, plantas de *Panicum* spp. e *Brachiaria* spp. empregadas no sequenciamento de alto desempenho foram utilizadas para detecção de JGMV por reação de transcrição reversa e amplificação (RT-PCR) conforme a otimização com *P. purpureum*.

Tabela 2.2: Etapas da PCR utilizadas para amplificação dos genes da CP.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	
Desnaturação Inicial	94	2 min	
35 ciclos	Desnaturação	94	30 s
	Anelamento	60	30 s
	Extensão	72	1 min
	Extensão Final	72	5 min
Espera	12	∞	

2.6. Clonagem da CP de JGMV das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho

Os fragmentos de DNA obtidos a partir da RT-PCR de aproximadamente 1,06 kb foram eluídos do gel de agarose utilizando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foram ligados em pGEM-T Easy vector (Promega) (Figura 2.2). A reação de ligação do fragmento amplificado foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante do vetor. O sistema de ligação foi montado com 1 µl de pGEM-T Easy Vector (50 ng/µl), 5 µl de tampão de ligação 2 X, 1 µl da enzima T4 DNA ligase (3 U/µl) e de 1,5 a 3 µl do fragmento amplificado, em um volume final de 10 µl. Em seguida, a reação foi incubada a 4 °C por 16 h. Após a ligação, o DNA foi precipitado com N-butanol e uma alíquota de 2 µl foi aplicada em 40 µl de células competentes de *Escherichia coli* DH5α para transformação por eletroporação. Em seguida foi adicionado 860 µl de meio LB líquido (solução autoclavada de 5 g NaCl, 5 g triptona e 2,5 g extrato de levedura, em 500 ml de água destilada, a pH 7,5) e incubou-se por 1 h a 37 °C. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (LB líquido adicionado de ágar bacteriológico) com ampicilina (100 µg/ml) e, posteriormente adicionado e espalhado na superfície, 40 µl de X GAL (20 mg/ml) e 10 µl de IPTG (100 mM) por placa. As placas foram incubadas por uma

noite a 37 °C. Todos os procedimentos seguiram as recomendações dos fabricantes e indicações contidas em SAMBROOK et al., (1989).

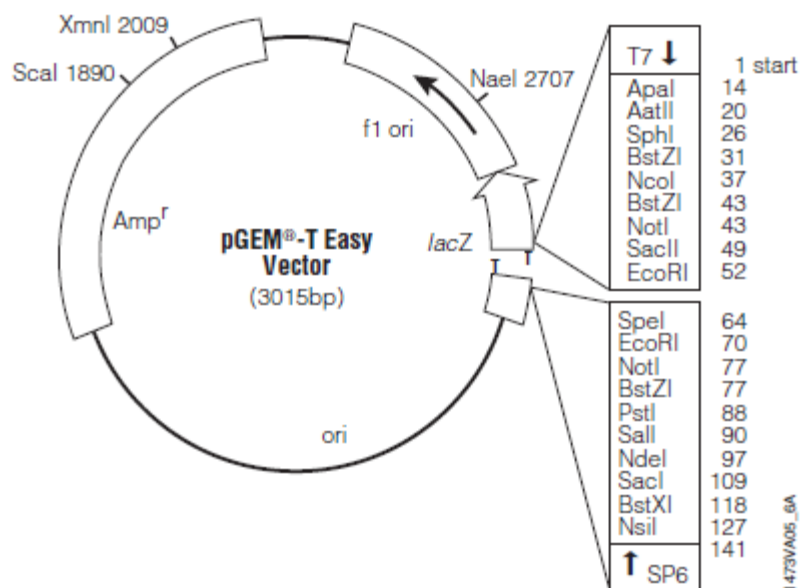


Figura 2.2: Esquema representativo do vetor plasmidial pGEM-T Easy Vector (Promega). O vetor comercial destinado a clonagem de produtos de PCR foi utilizado para realizar o isolamento dos fragmentos de 1,06 kb relativos à CP, para detecção e estudos de filogenia do JGMV.

2.7. Isolamento da região 3' do genoma de JGMV - 3'RACE

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

Para a determinação da região 3'UTR, folhas de PM-H8 com sintoma de vírus foram utilizadas para a extração de RNA Total utilizando o kit ZR Plant RNA MiniPrep™, seguindo instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa

SuperScript III (Invitrogen), utilizando os *primers* descritos a Tabela 2.3. A reação de transcrição reversa constituiu de 5 µl de RNA total, 1 µl de dNTP, 1 µl do primer M10 para a primeira RT e JGMV9532R_UTR3 para a segunda RT, e 5 µl de H₂O DEPC, seguida de 5 min de incubação a temperatura de 65 °C para abrir a fita RNA. Posteriormente foi adicionado 4 µl de 5X First-Strand Buffer, 2 µl de DTT, 1 µl da enzima SuperScript III e 1 µl de RNase out. A temperatura de incubação utilizada nesta etapa foi de 55 °C, seguida por um período de incubação de 70 °C por 15min para a inativação da enzima.

Um primeiro par de *primers* foi utilizado para a amplificação do fragmento de 568 pb correspondente a região 3'UTR. A partir da região amplificada anteriormente, o segundo par de *primer* foi sintetizado para a amplificação de um fragmento de 552 pb, pois com o primeiro par de *primers* não foi possível obter o completo resgate da região 3'UTR. Os *primers* utilizados nesta etapa foram desenhados a partir da sequência obtida no NGS, e estão descritos na Tabela 2.3. A Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) foi utilizada para as amplificações. As reações utilizaram 1 µl dos *primers* descritos na Tabela 2.3 para primeira e segunda PCR, 5 µl de 10X PCR Buffer, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de dNTP, 1 µl de Taq DNA Polymerase Platinum, 3 µl do cDNA e 36 µl de H₂O, para um volume final de 50 µl. As condições da PCR utilizadas nesta etapa estão descritas na Tabela 2.2.

Tabela 2.3: Conjunto de *primers* utilizados na amplificação da região 3'UTR

Primes	Sequência	Amplificação (pb)
JG39,260-F	5'AGAGCGACACACGGCAGCAGATGTCACA 3'	568
OligodTM10	5'AAGCAGTGTTATCAACGCAGA 3'	
JGMV9532R_UTR3	5'CTGTCTGATGCTGAGGGTCC 3'	552
JGMV9161F_UTR3	5'AAGCAGCTGCCATCAGAGGG 3'	

2.8. Isolamento da região 5' do genoma de JGMV - 5'RACE

Para a amplificação da extremidade 5' utilizou-se o kit 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. O 5'RACE consiste em uma estratégia para amplificar por RT-PCR a extremidade 5' não conhecida de

um mRNA a partir de fragmentos internos de sequência conhecida. A síntese de cDNA é feita utilizando *primer* “reverso”. Uma sequência homopolimérica, neste caso de Citidina (Citosina) é adicionada a extremidade 3’ com a enzima Terminal Desoxinucleotídeo Transferase (TdT). A primeira PCR é realizada com um segundo *primer* específico, mais interno ao primeiro e um *primer* complementar a região adicionada que possui uma região âncora que vai ser utilizada nas próximas rodadas de PCR (Primer AAP-Poli G). Na segunda etapa, um terceiro *primer* específico, mais interno ao segundo é utilizado, e o *primer* AUAP que vai anelar a região âncora da primeira PCR.

Para isolamento da região 5’, folhas com sintoma de vírus de *Panicum maximum* Híbrido - H8 foram utilizadas para a extração de RNA Total utilizado o kit ZR Plant RNA MiniPrep™, seguindo instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen), e os *primer* específicos utilizados tanto para a síntese do cDNA quanto para as etapas de PCR foram: JGMV-GSP 400 5’ GGGTGGATTTTGGTTGTCAC 3’, JGMV- GSP 341 5’ CCTCGGCTCGTGTCCTAAT 3’ e GSP 115 5’ATTGTGCATTATTGCCCTCTG 3’.

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 10 µl de RNA total, 1 µl do primer JGMV 400R (50 µM), 1 µl de dNTP, e foi incubada a 75 °C por 3 min. Em seguida foi adicionado 4 µl do tampão de enzima 5X First-Strand Buffer, 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de RNaseOUT (40 U/µl, Invitrogen) e 1 µl da enzima SuperScript™ III RT (200 U/µl) em um volume final de 20 µl. Posteriormente a amostra foi incubada a 52 °C por 1 h para a síntese do cDNA e 75 °C por 15 min para a desativação da enzima. Após essa etapa foi adicionado 1 µl de RNase H para eliminar o RNA molde pareado com o DNA complementar sintetizado e 0,5 µl de RNase A para eliminar qualquer RNA presente na solução.

Após a síntese do cDNA, a RT foi purificada utilizando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare) antes da síntese da sequência homopolimérica de desoxicitidina. Para a síntese da sequência homopolimérica, a reação foi composta de 5 µl de 10X Terminal Transferase Reaction Buffer, 5 µl de CoCl₂ (2,5 mM), 20 µl de cDNA, 0,5 µl de dCTP (10 mM), 0,5 µl de Terminal Transferase (20 u/µl) e 9 µl de H₂O para uma reação final de 40 µl. Em seguida a reação foi incubada a 37 °C por 30 min e 70 °C por 10 min para a desativação da enzima. Esta reação foi utilizada nas etapas posteriores de PCR.

As ampliações foram realizadas de acordo com o kit 5'RACE invitrogen, seguindo as instrues do fabricante utilizando a LongAmp Taq DNA Polimerase para a ampliação dos fragmentos. Posteriormente foi feito um gel de agarose 1% para visualizaão dos fragmentos amplificados.

2.9. Árvore filogenética

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

Para análise filogenética, foram utilizadas sequências de aminoácidos e nucleotídeos do genoma completo dos isolados brasileiros de JGMV (JGMV-BR e JGMV-Penni) juntamente com sequências de referência (RefSeq) dos vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* depositas no GenBank, que estão descritos na Tabela 2.4.

Além disso, as sequências de nucleotídeo da CP dos isolados clonados separadamente, oriundos das plantas utilizadas no NGS também foram utilizadas para as construes das árvores filogenéticas, juntamente com sequências da capa proteína do JGMV depositadas no GenBank. Apesar de já terem identificado JGMV em outros países, no banco de dados GenBank somente foram depositadas sequências da CP dos isolados provenientes da Austrália e EUA, sendo estes utilizados na construo desta filogenia. O programa SDT (Sequence Demarcation Tool) (MUHIRE et al., 2014) foi utilizada para a construo da matriz de identidade por escala de cores para visualizaão de níveis de identidade entre as sequências analisadas da CP.

Tabela 2.4: Sequências do gênero *Potyvirus* utilizadas na árvore filogenética do genoma completo

Espécie	Nº Acesso GenBank
<i>Japanese yam mosaic virus</i>	NC_000947
<i>Plum pox virus</i>	NC_001445
<i>Pepper mottle virus</i>	NC_001517

<i>Tobacco etch virus</i>	NC_001555
<i>Potato virus Y</i>	NC_001616
<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>	NC_001671
<i>Tobacco vein mottling virus</i>	NC_001768
<i>Papaya ringspot virus</i>	NC_001785
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	NC_001841
<i>Turnip mosaic virus</i>	NC_002509
<i>Peanut mottle virus</i>	NC_002600
<i>Soybean mosaic virus</i>	NC_002634
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	NC_003224
<i>Maize dwarf mosaic virus</i>	NC_003377
<i>Bean common mosaic virus</i>	NC_003397
<i>Sugarcane mosaic virus</i>	NC_003398
<i>Scallion mosaic virus</i>	NC_003399
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	NC_003492
<i>Clover yellow vein virus</i>	NC_003536
<i>Dasheen mosaic virus</i>	NC_003537
<i>Lettuce mosaic virus</i>	NC_003605
<i>Johnsongrass mosaic virus</i>	NC_003606
<i>Cocksfoot streak virus</i>	NC_003742
<i>Potato virus V</i>	NC_004010
<i>Leek yellow stripe virus</i>	NC_004011
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	NC_004013
<i>Sorghum mosaic virus</i>	NC_004035
<i>Potato virus A</i>	NC_004039
<i>Bean common mosaic necrosis virus</i>	NC_004047
<i>Wild potato mosaic virus</i>	NC_004426
<i>Peru tomato mosaic virus</i>	NC_004573

<i>Yam mosaic virus</i>	NC_004752
<i>Papaya leaf-distortion mosaic virus</i>	NC_005028
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	NC_005029
<i>Oat necrotic mottle virus</i>	NC_005136
<i>Lily mottle virus</i>	NC_005288
<i>Beet mosaic virus</i>	NC_005304
<i>Chilli veinal mottle virus</i>	NC_005778
<i>Agropyron mosaic virus</i>	NC_005903
<i>Hordeum mosaic virus</i>	NC_005904
<i>Watermelon mosaic virus</i>	NC_006262
<i>Cucumber vein yellowing virus</i>	NC_006941
<i>Pennisetum mosaic virus</i>	NC_007147
<i>Thunberg fritillary virus</i>	NC_007180
<i>Wisteria vein mosaic virus</i>	NC_007216
<i>Shallot yellow stripe virus</i>	NC_007433
<i>East Asian Passiflora virus</i>	NC_007728
<i>Konjac mosaic virus</i>	NC_007913
<i>Daphne mosaic virus</i>	NC_008028
<i>Pepper severe mosaic virus</i>	NC_008393
<i>Blackberry virus Y</i>	NC_008558
<i>Narcissus degeneration virus</i>	NC_008824
<i>Basella rugose mosaic virus</i>	NC_009741
<i>Telosma mosaic virus</i>	NC_009742
<i>Wild tomato mosaic virus</i>	NC_009744
<i>Banana bract mosaic virus</i>	NC_009745
<i>Wheat eqlid mosaic virus</i>	NC_009805
<i>Tobacco vein banding mosaic virus</i>	NC_009994
<i>Moroccan watermelon mosaic virus</i>	NC_009995

<i>Squash vein yellowing virus</i>	NC_010521
<i>Verbena virus Y</i>	NC_010735
<i>Algerian watermelon mosaic virus</i>	NC_010736
<i>Fritillary virus Y</i>	NC_010954
<i>Narcissus yellow stripe virus</i>	NC_011541
<i>Zantedeschia mild mosaic virus</i>	NC_011560
<i>Pepper veinal mottle virus</i>	NC_011918
<i>Cassava brown streak virus</i>	NC_012698
<i>Triticum mosaic virus</i>	NC_012799
<i>Canna Yellow Streak virus</i>	NC_013261
<i>Sugarcane streak mosaic virus</i>	NC_014037
<i>Sunflower chlorotic mottle virus</i>	NC_014038
<i>Freesia mosaic virus</i>	NC_014064
<i>Panax virus Y</i>	NC_014252
<i>Bidens mottle virus</i>	NC_014325
<i>Pepper yellow mosaic virus</i>	NC_014327
<i>Brugmansia suaveolens mottle virus</i>	NC_014536
<i>Sweet potato virus C</i>	NC_014742
<i>Passion fruit woodiness virus</i>	NC_014790
<i>Ugandan cassava brown streak virus</i>	NC_014791
<i>Lupine mosaic virus</i>	NC_014898
<i>Apium virus Y</i>	NC_014905
<i>Celery mosaic virus</i>	NC_015393
<i>Hardenbergia mosaic virus</i>	NC_015394
<i>Chilli ringspot virus</i>	NC_016044
<i>Keunjong mosaic virus</i>	NC_016159
<i>Yam bean mosaic virus</i>	NC_016441
<i>Tomato necrotic stunt virus</i>	NC_017824

<i>Hippeastrum mosaic virus</i>	NC_017967
<i>Sweet potato virus 2</i>	NC_017970
<i>Vallota speciosa virus</i>	NC_017977
<i>Sweet potato virus G</i>	NC_018093
<i>Arracacha mottle virus</i>	NC_018176
<i>Chinese yam necrotic mosaic virus</i>	NC_018455
<i>Caladenia virus A</i>	NC_018572
<i>Iranian johnsongrass mosaic virus</i>	NC_018833
<i>Pokeweed mosaic virus</i>	NC_018872
<i>Rose yellow mosaic virus</i>	NC_019031
<i>Ornithogalum mosaic virus</i>	NC_019409
<i>Yam mild mosaic virus</i>	NC_019412
<i>Blue squill virus A</i>	NC_019415
<i>Colombian datura virus</i>	NC_020072
<i>Brugmansia mosaic virus</i>	NC_020105
<i>Sweet potato latent virus</i>	NC_020896
<i>Sunflower mild mosaic virus</i>	NC_021065
<i>Calla lily latent virus</i>	NC_021196
<i>Donkey orchid virus</i>	NC_021197
<i>Habenaria mosaic virus</i>	NC_021786
<i>Tall oatgrass mosaic virus</i>	NC_022745
<i>Bidens mosaic virus</i>	NC_023014
<i>Zucchini tigre mosaic virus</i>	NC_023175
<i>Narcissus late season yellows</i>	NC_023628
<i>Yellow oat-grass mosaic virus</i>	NC_024471
<i>Carrot thin leaf virus</i>	NC_025254
<i>Vanilla distortion mosaic virus</i>	NC_025250
<i>Asparagus virus 1</i>	NC_025821

3. Resultados

3.1. Microscopia eletrônica

O primeiro indício da presença de um *Potyvirus* em plantas forrageiras analisadas veio com a observação de partículas alongadas por microscopia eletrônica de transmissão, sendo esta uma das características de espécies virais do gênero *Potyvirus* (Figura 2.3). Após a visualização em microscópio eletrônico, sugerindo uma possível infecção por *Potyvirus*, foi realizado o sequenciamento do genoma completo a partir de amostras de RNA total, confirmando a presença de *Potyvirus* via sequenciamento genético, análise filogenética e comparação de genoma viral.

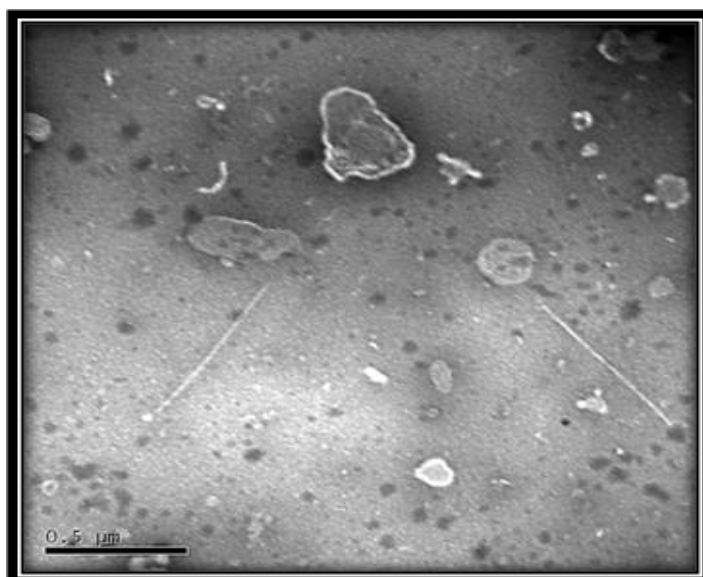


Figura 2.3: Microscopia eletrônica de transmissão. O isolado de *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) foi obtido de *Pennisetum purpureum*, onde amostras obtidas foram fixadas com 2% de ácido fosfotúngstico (Foto: Tatsuya Nagata)

3.2. Purificação viral e preparação de amostra para o sequenciamento.

Após a purificação viral de partículas alongadas a partir das amostras infectadas de plantas de *Panicum* spp., *Brachiaria* spp. e *P. purpureum*, o extrato viral foi submetido à extração de RNA total. O produto da extração foi visualizado em gel de agarose 1% utilizando TBE com água DEPC para a observação da qualidade dos RNAs extraídos e para

avaliar à presença de RNA ribossomal. A contaminação de RNA ribossomal é um problema no sequenciamento genético e deve ser removido previamente à esta etapa. (Figura 2.4).

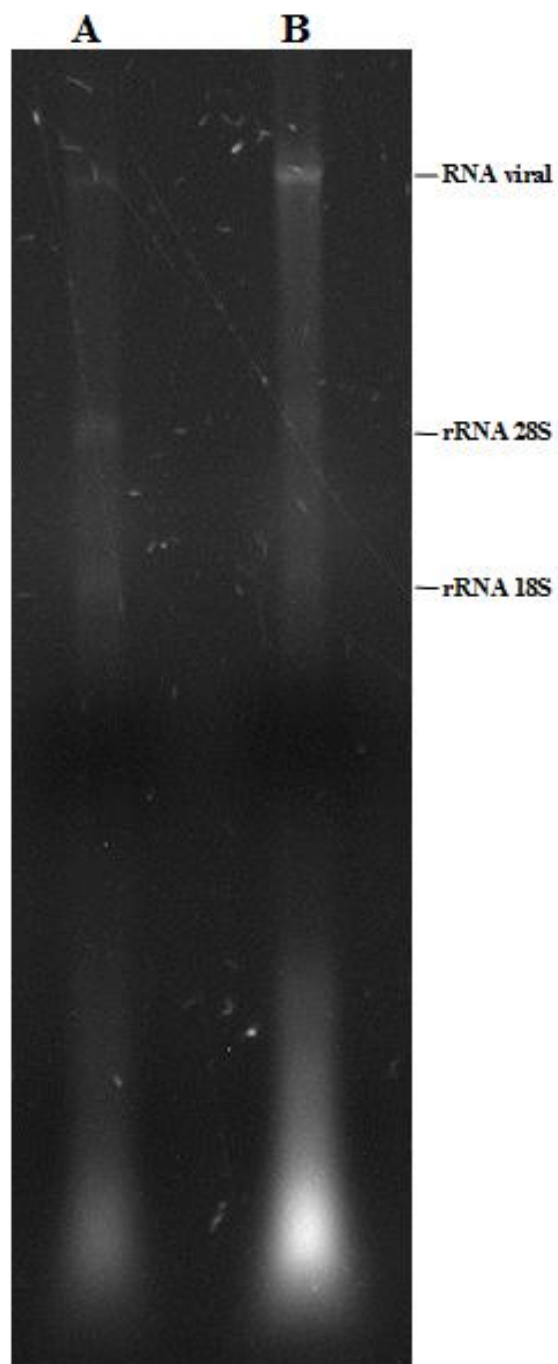


Figura 2.4: Gel de RNA 1% extraído a partir de amostra purificadas em colchão de sacarose 20%. (A) *Panicum* (B) *Brachiaria*

3.3. Detecção de JGMV em *Pennisetum purpureum* Linhagem CNPGL 00211

A primeira detecção de *Johnsongrass mosaic virus* ocorreu em plantas de *Pennisetum purpureum* CNPGL 00211. A detecção por RT-PCR foi feita utilizando oligodT₅₀M10 e primers universais degenerados para *Potyvirus*, PY11 e M10 (Figura 2.5). Com isso, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 2,0 kb (Figura 2.6), com tamanho superior ao fragmento esperado de 1,7 kb (normalmente amplificado para isolados de *Potyvirus* empregando-se *primers* universais), correspondendo a parte do gene da proteína Nib, ao gene completo da CP e a região 3'UTR. A Figura 2.5 demonstra a região amplificada do genoma viral. Após a detecção do vírus, para a obtenção do genoma completo, foi realizado a purificação viral, e posteriormente o sequenciamento utilizando a plataforma Illumina MiSeq.

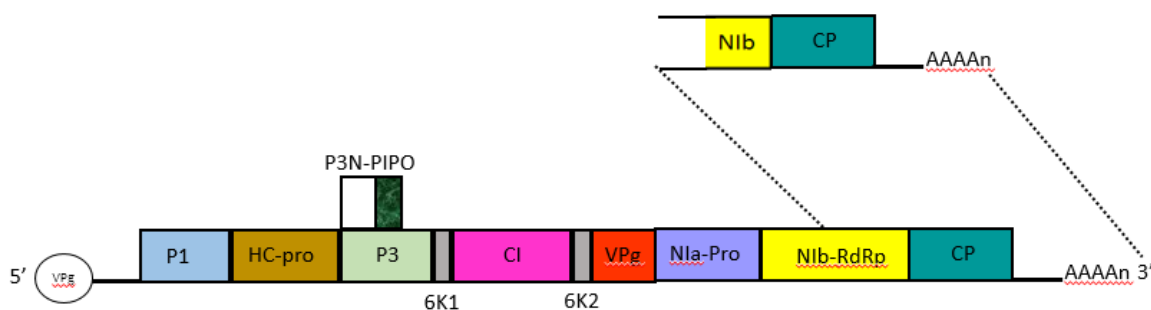


Figura 2.5: Representação esquemática da organização genômica dos *Potyvirus*. Em destaque na parte superior a região amplificada pelos primers PY11 e M10 via RT-PCR.

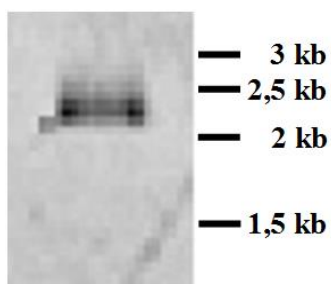


Figura 2.6: Detecção de JGMV em PP-211. Amplificação de um fragmento de aproximadamente 2 kb utilizando os *primers* universais para *Potyvirus* PY11 e M10.

O fragmento de aproximadamente 2,0 kb amplificado por RT-PCR foi clonado no vetor pGEM-T Easy. Várias colônias brancas foram obtidas como resultado da transformação por eletroporação. Das colônias positivas, quatro delas foram isoladas individualmente, das quais, o DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. Após a digestão enzimática pode-se observar que ocorreu a liberação do fragmento de aproximadamente 2,0 kb correspondente ao DNA clonado (Figura 2.7). Os quatro clones correspondentes às transformações foram selecionados e sequenciados com os primers T7 e SP6.

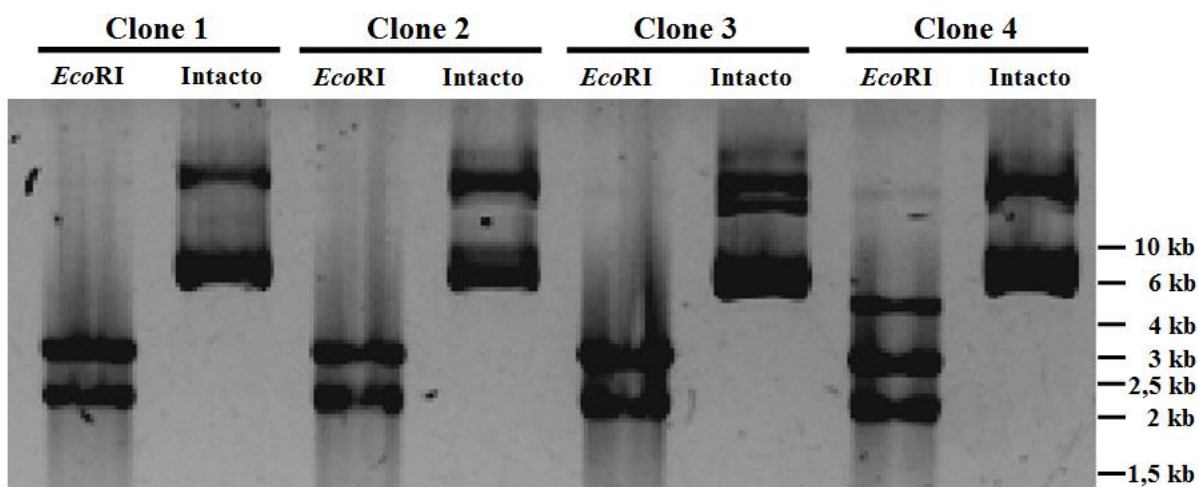


Figura 2.7: Confirmação de clonagem. Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones 1, 2, 3 e 4 de JGMV originário da planta de PP-211. Liberação do fragmento de aproximadamente 2 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

As sequências dos clones foram analisadas, e uma sequência consenso foi gerada a partir dos quatro clones selecionados e sequenciados. A sequência do inserto continha 2.000 nucleotídeos, apresentando uma única ORF a partir da posição 1 até a 1.563, e seguido pela região 3' não traduzida (3'UTR) com tamanho de 472 nucleotídeos e uma cauda poliA. A sequência nucleotídica foi depositada no GenBank com o número de acesso KC333416.1.

A sequência de nucleotídeos foi utilizada para a dedução da sequência de aminoácidos, que resultou em uma poliproteína sem códon de iniciação contendo 566 resíduos de aminoácidos (aa), incluindo 206 aa da porção C-terminal da proteína de inclusão nuclear b (Nib) e toda a CP com o tamanho de 360 aa. O provável sítio de clivagem entre a proteína Nib/CP seria VDVEHQ₂₁₃/S₂₁₄, baseado na descrição de sítio de clivagem mais frequente para espécies de *Potyvirus* (ADAMS et al., 2005; SHUKLA E GOUGH, 1993).

A sequência do motivo GDD conservado na polimerase de *Potyvirus*, (SHUKLA et al., 1994) foi encontrado na proteína Nib na posição 44-46 a partir do início da sequência obtida da Nib. O motivo GDD tem sido relatado como o sítio da atividade da RNA polimerase RNA dependente (DONIER et al., 1987). Outro motivo importante encontrado, que é conservado entre os *Potyvirus*, é o motivo DAG, que está relacionado com a transmissão pelo inseto vetor, especificamente afídeos, localizado neste caso, na posição de 3-5, a partir do sítio de clivagem Q/G da CP.

A sequência de nucleotídeos da CP apresentou 78% de identidade com o *Johnsongrass mosaic virus* (NC_003606) da Austrália e 65% com *Canna yellow streak virus* (KM882642), os *Potyvirus* mais próximos ao JGMV-Penni. A sequência deduzida de aminoácidos apresentou identidade de 80% com o *Johnsongrass mosaic virus* (NC_003606) australiano e 62% com *Canna yellow streak virus* (NC_013261). No entanto, é interessante ressaltar, que a sequência de aminoácidos do N-terminal da CP do isolado JGMV-Penni da Bahia é significativamente distinta das sequências de JGMV relatadas no GenBank.

Os resultados descritos acima foram publicados ano de 2013 como um primeiro resultado desta dissertação na forma de uma *Disease Notes* com o título "First Report

of *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) Infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil” no periódico científico Plant Disease (Em Anexo).

3.4. Sequenciamento do genoma completo do isolado JGMV-Penni e JGMV-BR utilizando a plataforma Illumina.

Para o sequenciamento do genoma completo de JGMV-BR, após a purificação viral, a amostra combinada foi enviada para o sequenciamento na Macrogen Inc (Coreia), utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000. Foram obtidos após o sequenciamento 40.599.252 milhões de *reads*, com tamanho aproximado de 100 pb. A montagem foi realizada gerando 8.432 *contigs*, dos quais 30 *contigs* correspondiam ao genoma do JGMV.

Para a obtenção do genoma completo de JGMV-Penni, após a purificação viral e posterior extração do RNA total, o RNA foi sequenciado na Universidade Católica de Brasília (UCB) utilizando a plataforma Illumina MiSeq System. Foram gerados após o sequenciamento 7.407.066 *reads*, que após processados geraram 7.402.180 *reads*. Desses, 28.967 correspondiam à sequência de *Johnsongrass mosaic virus*. A montagem foi realizada gerando 1.335 *contigs*, dos quais 2 *contigs* correspondiam ao genoma do JGMV

O consenso gerado a partir dos *contigs* montados, revelou a presença de dois vírus com tamanho do genoma de 9.177 nt, tanto para o isolado JGMV-BR quanto para o isolado JGMV-Penni, excluindo a cauda poliA e regiões não traduzidas. As regiões 5'UTR e 3'UTR, após confirmadas pelo sequenciamento Sanger, apresentaram 178 nt (5'UTR) e 472 nt (3'UTR) de tamanho para o isolado JGMV- BR, e a região 3'UTR com 472 nt de tamanho para o isolado de JGMV-Penni. Até o presente, a região 5'UTR deste último isolado ainda não foi clonada utilizando o sistema 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). *Primers* reversos específicos já foram sintetizados, de acordo com o genoma obtido a partir do sequenciamento de alto desempenho, para a conclusão do sequenciamento dessa região.

A análise do genoma viral após o sequenciamento completo dos dois isolados de JGMV revelou que ambos codificam uma poliproteína, denominada ORF1 (Open reading frame), com 3.058 resíduos de aminoácidos (aa) e massa molecular de 347,84 kDa (JGMV-BR) e 347,64 kDa (JGMV-Penni), começando no start códon AUG na posição 179 e terminando no stop códon UAA na posição 9355 para o vírus JGMV-BR. A pequena

ORF2, codifica a proteína P3N+PIPO que encontra-se incorporada no cístron da P3 identificada com o motivo conservado G₁A₆ na posição 2.737-3.038 para o isolado JGMV-BR e na posição 2.738-3.042 para o isolado JGMV-Penni possuindo 90 aa para os dois isolados. A poliproteína codifica 10 proteínas multifuncionais, sendo elas P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-pro, NIb e CP.

A análise comparativa entre as sequências nucleotídicas do genoma completo de JGMV-BR e o genoma parcial do JGMV-Penni com sequências genômicas de outros vírus disponíveis no banco de dados (GenBank), revelou que os dois vírus em estudos apresentaram maior identidade nucleotídica com *Johnsongrass mosaic virus* (NC_003606) originário da Austrália de 82% (JGMV-BR) e 81% (JGMV-Penni) e de 91% entre os dois isolados, quando comparados entre si. A identidade de nucleotídeo da CP apresentou 77% para o isolado JGMV-BR e 78% para o JGMV-Penni quando comparada com o mesmo vírus (JGMV-NC_003606) (Tabelas 2.5 e 2.6). A análise comparativa da identidade de aminoácidos (aa) da CP com o JGMV depositado no GenBank apresentou ser 80% para os dois isolados em estudo. Além do JGMV australiano, os vírus que mostraram ser mais relacionados com os dois isolados comparando a CP foram: *Cana yellow streak virus* com, *Sorghum mosaic virus* com, *Sugarcane mosaic virus* com, *Maize dwarf mosaic virus*, *Cocksfoot streak virus* de identidade e *Pennisetum mosaic virus* (Tabelas 2.5 e 2.6).

Tabela 2.5: Porcentagem de identidade de nucleotídeo do genoma completo e de partes do genoma correspondendo a cada proteína do JGMV-BR com sequências de *Potyvirus* mais estreitamente relacionados

Vírus*	Genoma completo	5'UTR	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	Nla-VPg	Nla-Pro	NIb	CP	3'UTR
JGMV-Penni	91	-	76	77	90	99	96	93	95	96	95	95	94
JGMV	82	44	73	82	84	87	84	86	81	85	84	77	85
CaYSV	65	58	49	65	64	62	69	62	65	62	69	65	24
MDMV	52	33	42	54	49	44	58	50	57	51	60	54	30
SCMV	53	33	44	55	46	44	57	49	56	53	62	59	27
SrMV	53	41	45	55	49	46	58	48	59	53	62	56	25
CSV	49	33	34	50	42	51	53	51	55	50	60	52	24
PenMV	53	31	43	54	48	46	57	48	59	53	62	58	28

**Potyvirus* cujas sequências foram comparadas: *Johnsongrass mosaic virus* (NC_003606-JGMV); *Maize dwarf mosaic virus* (NC_003377- MDMV); *Sugarcane mosaic virus* (NC_003398-SCMV); *Cocksfoot streak virus* (NC_003742-CSV); *Canna yellow streak virus* (NC_013261-CAYSV); *Sorghum mosaic virus* (NC_004035-SrMV); *Pennisetum mosaic virus* (NC_007147-PenMV)

*Genoma Parcial: utilizando somente 9,649 nt

Tabela 2.6: Porcentagem de identidade de nucleotídeo do genoma parcial e de partes do genoma correspondendo a cada proteína do JGMV-Penni com sequências de *Potyvirus* mais estreitamente relacionados

Vírus*	*Genoma parcial	5'UTR	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	Nla-VPg	Nla-Pro	NIb	CP	3'UTR
JGMV-BR	91	-	76	77	90	99	96	93	95	96	95	95	94
JGMV	81	-	70	76	85	86	84	83	81	84	85	78	85
CaYSV	63	-	51	66	64	61	69	60	66	62	70	65	31
MDMV	53	-	43	53	49	43	57	49	57	51	61	54	31
SCMV	54	-	41	56	49	44	58	47	54	53	61	59	27
SrMV	54	-	44	54	50	45	58	45	59	53	62	57	25
CSV	49	-	33	49	44	52	53	54	53	49	59	52	27
PenMV	54	-	44	54	49	47	58	50	58	53	62	58	30

**Potyvirus* cujas sequências foram comparadas: *Johnsongrass mosaic virus* (NC_003606-JGMV); *Maize dwarf mosaic virus* (NC_003377- MDMV); *Sugarcane mosaic virus* (NC_003398-SCMV); *Cocksfoot streak virus* (NC_003742-CSV); *Canna yellow streak virus* (NC_013261-CAYSV); *Sorghum mosaic virus* (NC_004035-SrMV); *Pennisetum mosaic virus* (NC_007147-PenMV)

*Genoma Parcial: utilizando somente 9,649 nt

Para a dedução do sítio de clivagem de cada poliproteína, as sequências de aminoácidos obtidas para os dois isolados foram submetidas a um alinhamento com a sequência do JGMV (NC_003606) e com outros vírus mais relacionados. Essas análises comparativas permitiram a determinação dos prováveis sítios de clivagem para os dois isolados (JGMV-BR e JGMV-Penni). Com base nas análises das sequências conservadas dos sítios de clivagem para a família *Potyviridae*, determinadas a partir de estudos anteriores, foram preditas dez proteínas maduras (P1, HC-Pro, P3, 6k1, CI, 6k2, NIa-VPg, NIa-pro, NIb e CP) produzidas a partir da poliproteína de cada isolado de JGMV em estudo.

A análise do sítio de clivagem da junção entre as proteínas P1/HC-Pro clivadas pela P1 serina protease no terminal carboxil, indica que esta ocorra entre os aminoácidos tirosina (Y) e serina (S) no sítio ativo (KQICHY₂₃₇/S₂₃₈) para o isolado JGMV-BR e KQIKHY₂₃₇/S₂₃₈ para o isolado JGMV-Penni, sendo observada uma diferença na posição +3, na qual no JGMV-BR é uma cisteína (C), e no JGMV-Penni é apresentando uma lisina (K). O processo de clivagem potencialmente origina uma proteína P1 com 237 aa e 27,5 kDa e 27,3 kDa, respectivamente, contendo os motivos conservados H₁₅₄-X₈-D₁₆₂-G₁₉₅-X-S₁₉₇-G₁₉₈ e o domínio proteolítico F₂₁₀IIRGR₂₁₅, apresentando maior identidade nucleotídica com JGMV Australiano de 73% (JGMV-BR) e 70% (JGMV-Penni) (Tabelas 2.5 e 2.6).

A junção entre as proteínas HC-Pro/P3, que é clivada pela HC-Pro protease no sítio de clivagem com resíduos de glicina (G/G), foi encontrada no contexto KEYIVG₆₉₈/G₆₉₉ para o isolado JGMV-BR e KEYMVG₆₉₈/G₆₉₉ para o isolado JGMV-Penni (Tabela 2.7), resultando em uma proteína com 453 aa e massa molecular de 52,5 kDa e 52,04 kDa. As análises das sequências de aminoácidos indicam a presença dos motivos conservados C₅₈₃-X₇₂-H₆₅₆, PTK e CSC. Esta proteína apresentou maior identidade de nt com a HC-Pro do JGMV australiano de 82% (JGMV-BR) e 76% (JGMV-Penni) (Tabelas 2.5 e 2.6).

O restante das sete junções (P3/6k1, CI/ 6k2, 6k2/VPg, Vpg/NIa-pro, NIa-pro/NIb, NIb/CP) são clivadas pela protease NIa-pro e estão detalhadas nas Tabelas 2.5 e 2.6 e apresentam em sua maioria, a sequência de aminoácidos XX(V/G)XX(Q/E)/(S/G/A), que em alguns casos, mostram algumas diferenças. As sequências de aminoácidos dos sítios de clivagem apresentado pelo dois vírus são ligeiramente diferentes daquelas já descritas para JGMV.

Tabela 2.7: Prováveis sítios de clivagem das poliproteínas de JGMV-BR e JGMV-Penni

Sítios de clivagem	Sequência de aa	Sequência de aa
	JGMV-BR	JGMV-Penni
P1/HC-pro	KQICHY ₂₃₇ /S ₂₃₈	KQIKHY ₂₃₇ /S ₂₃₈
HC-Pro/P3	KEYIVG ₆₉₈ /G ₆₉₉	KEYMVG ₆₉₈ /G ₆₉₉
P3/6k1	TEVEHE/ ₁₀₄₅ R ₁₀₄₆	TEVEHE ₁₀₄₅ /R ₁₀₄₆
6K1/ CI	EVKHEG ₁₀₉₈ /S ₁₀₉₉	EVKHEG ₁₀₉₈ /S ₁₀₉₉
CI/6K2	EXVCKE ₁₇₅₈ /L ₁₇₅₉	ENVCKE ₁₇₅₈ /L ₁₇₅₉
6K2/VPg	TEVEHE ₁₈₀₃ /G ₁₈₀₄	TEVEHE ₁₈₀₃ /G ₁₈₀₄
VPg-NIa/NIa-Pro	PEVEHE ₁₉₉₂ /G ₁₉₉₃	PEVEHE ₁₉₉₂ /G ₁₉₉₃
NIa-Pro/NIb	ERVSNE ₂₂₃₃ /S ₂₂₃₄	ERISNE ₂₂₃₃ /S ₂₂₃₄
NIb/CP	VDVXHQ ₂₇₅₀ /S ₂₇₅₁	VDVEHQ ₂₇₅₀ /S ₂₇₅₁

As análises da sequência de aminoácidos para a junção P3/6K1, o sítio de clivagem foi deduzido no contexto TEVEHE₁₀₄₅/R₁₀₄₆ para os dois vírus (Tabela 2.7), com resíduo de arginina (R) ocorrendo na posição -1. A proteína P3 liberada possui a massa molecular de 39,8 kDa (JGMV-BR) e 39,7 kDa (JGMV-Penni), ambas apresentando maior identidade de nucleotídeo de 84% e 85%, respectivamente com o JGMV (Tabelas 2.5 e 2.6).

A junção 6K1/CI, potencialmente libera uma proteína 6K1 de 6 kDa para os dois vírus, com resíduos de glicina e serina no contexto EVKHEG₁₇₅₇/SQ₁₇₅₈ para ambos os vírus (Tabela 2.7) e a maior identidade de nt foi observada com o JGMV de 86% (JGMV-BR) e 87% (JGMV-Penni) (Tabelas 2.5 e 2.6).

A proteína CI é liberada pela clivagem da junção CI/6K2, e foi encontrada no contexto EXVCKE₁₇₅₈/L₁₇₅₉ (Tabela 2.7) para o isolado JGMV-BR e ENVCKE₁₇₅₈/L₁₇₅₉ para o isolado JGMV-Penni, com resíduo de leucina na posição +1 do sítio de clivagem. Os motivos conservados de sítio de ligação a nucleotídeo G₁₁₈₄NVGSGKS/T₁₁₉₃ e o motivo de RNA helicase D₁₂₇₃ECH₁₂₇₇, bem como, os motivos conservados VATNIIENGNTL₁₄₂₉,

GRRIQRLGRVGR₁₄₇₃ foram encontrados na sequência de aminoácidos desta proteína CI. Uma pequena diferença foi encontrada no motivo LVYV presente no JGMV-Penni, mas que no isolado JGMV-BR é LIYV, portanto, exibindo uma variação na posição 2 pela presença do resíduo de isoleucina. Esta proteína possui massa molecular calculada em 74,2 kDa (JGMV-BR) e 74,4 kDa (JGMV-Penni), apresentando ambas a maior identidade de aminoácidos com JGMV australiano de 84% (Tabelas 2.5 e 2.6).

Para a junção 6K2/VPg, o sítio de clivagem ocorre no contexto TEVEHE₁₈₀₃/G₁₈₀₄ (Tabela 2.7), para os dois vírus no resíduo de ácido glutâmico e glicina, liberando uma proteína 6K2 com massa molecular de 6 kDa para ambos os isolados. Essa proteína compartilha identidade de 83% nos nucleotídeos com JGMV australiano (Tabelas 2.5 e 2.6).

A proteína NIa-VPg com massa molecular de 21,6 kDa para os dois vírus é liberada a partir do processamento da junção NIa-VPg/NIa-pro no sítio de clivagem PEVEHE₁₉₉₂/G₁₉₉₃ (Tabela 2.7), ocorrendo nos resíduos de ácido glutâmico e glicina e possui maior identidade de nucleotídeo de 81% com o JGMV para ambos os vírus (Tabelas 2.5 e 2.6).

A protease NIa-Pro é liberada a partir da clivagem da junção NIa-Pro/NIb pelo contexto ERVSNE₂₂₃₃/S₂₂₃₄ para o isolado JGMV-BR e ERISNE₂₂₃₃/S₂₂₃₄ para o isolado JGMV-Penni (Tabela 2.7). O motivo conservado H₂₀₃₇-X_{34(D)}-D₂₀₈₁-X_{69(T)}-C₂₁₄₁, foi encontrado na sequência dos dois isolados na mesma posição. A massa molecular desta proteína nos dois isolados é de 27 kDa, cujas sequências de nucleotídeos compartilham a maior identidade de 85% (JGMV-BR) e 84% (JGMV-Penni) com o JGMV (Tabelas 2.5 e 2.6).

A liberação das proteínas NIB e CP foi identificada nos dois isolados no sítio de clivagem no contexto VDVXHQ₂₇₅₀/S₂₇₅₁ (Tabela 2.7), para o isolado de JGMV-BR e VDVEHQ₂₇₅₀/S₂₇₅₁ para o isolado JGMV-Penni localizados nos resíduos de glutamina e serina. Essas apresentam uma massa molecular de 59,4 kDa para o isolado JGMV-BR e 59,7 kDa para o isolado JGMV-Penni. Na proteína NIB foram identificados os motivos SLKAEI₂₄₀₇, ADGSQFD₂₄₈₅, C₂₄₇₆DADGS₂₄₈₂ e GDD₂₅₈₅ conservados nos dois vírus nas mesmas posições. A maior identidade nucleotídica desta proteína foi de 84% e 85% com o JGMV (Tabelas 2.5 e 2.6). A proteína CP, com massa molecular de 34 kDa para os dois

vírus, apresentou os motivos DAG₂₇₅₇, QMKAAA₃₀₁₅ e ₃₀₁₆, MVWAIENGTSP₂₉₁₇ e ₂₉₁₈ AFDF₂₉₉₃ e ₂₉₉₄ e TMMD₂₉₂₇ e ₂₉₂₈ conservados em ambos os isolados. O maior valor de identidade de nt foi com a sequência da CP de JGMV australiano de 77% e 78%, respectivamente (Tabelas 2.5 e 2.6).

3.5. Isolamento e sequenciamento da região 3' do genoma de JGMV

Para a confirmação da região 3'UTR do isolado JGMV-BR, foi utilizado o par de *primers* oligodT₅₀M10 e JG3'9,260_F1 e M10 para a RT-PCR, sendo possível observar a amplificação de um fragmento de 568 pb, porém, com esta combinação de *primers*, não foi possível obter o completo resgate da região de interesse (3'UTR). O segundo par de *primers* JGMV9532R_UTR3 e JGMV9161F_UTR3 foi utilizado, o qual amplificou um fragmento de 552 pb, obtendo assim a região 3'UTR por completo. Os referidos fragmentos de 568 pb e 552 pb poder ser visualizados na Figura 2.8.

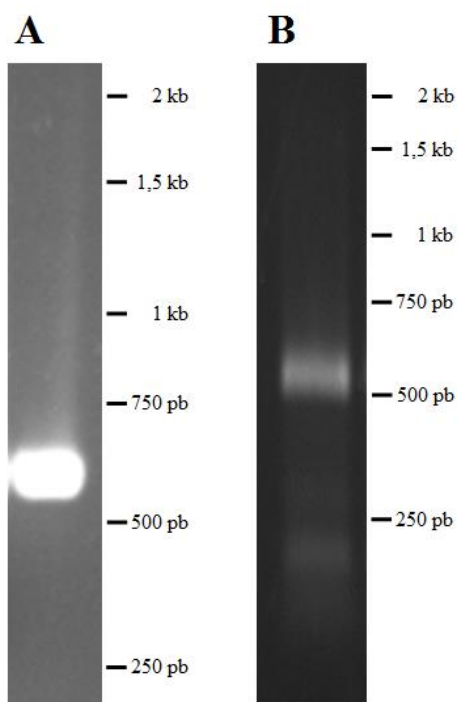


Figura 2.8: Amplificação da região 3'UTR. (A) Primeira PCR utilizando o par de primers JG3'9,260_F1 e oligodT₅₀M10 amplificando um fragmento de 568 pb. (B) Segunda PCR utilizando o par de primers JGMV9161F_UTR3 e JGMV9532R_UTR3 amplificando um fragmento de 552 pb A amostra PM-H8 foi utilizada nesta etapa.

3.6. Isolamento e sequenciamento da região 5' do genoma de JGMV via a técnica de 5'RACE

Para o isolamento da região 5'UTR do genoma do isolado JGMV-BR, *primers* anti-sense foram sintetizados para a confirmação da extremidade 5' do genoma viral. Pela técnica de 5'RACE, foi possível amplificar três fragmentos com tamanhos variáveis de 300 pb, 400 pb e 500 pb. O fragmento de aproximadamente 300 pb foi selecionado e enviado para sequenciamento. No entanto, dados posteriores de sequenciamento por Illumina, indicaram que a sequência do 5'UTR pode ser mais longa, e portanto, os outros fragmentos de tamanho maior serão também clonados e sequenciados. Os referidos fragmentos de 300, 400 e 500 pb podem ser visualizados na Figura 2.9.

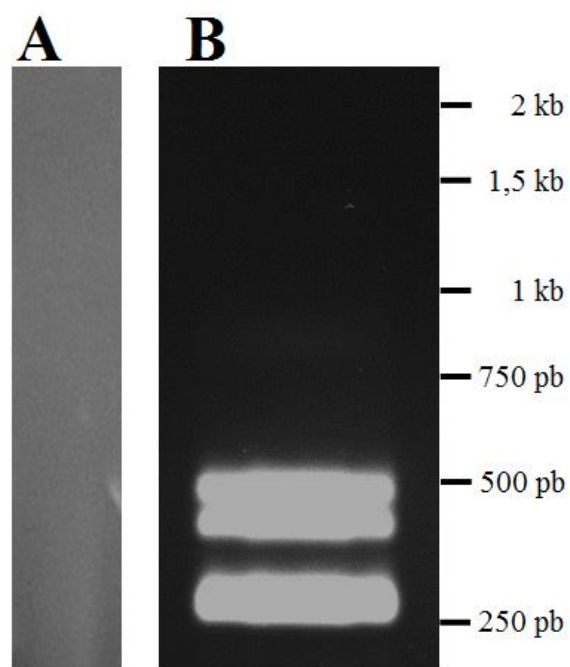


Figura 2.9: Análise do produto de PCR em gel de agarose 1% mostrando os fragmentos amplificados da região 5'UTR via a técnica de 5'RACE. (A) primeira rodada de PCR; (B) Segunda rodada de PCR

3.7. Análise filogenética utilizando sequências de nucleotídeos e aminoácidos da poliproteína dos isolados JGMV-Penni e JGMV-BR

As árvores filogenéticas para o genoma completo (nt e aa) revelaram que os dois isolados brasileiros de JGMV são filogeneticamente relacionados com o JGMV australiano, e ambos são relacionados ao *Canna yellow streak virus*. Além disso, estas espécies agrupam-se em um clado cujos membros infectam exclusivamente monocotiledôneas (Figuras 2.10 e 2.11). Portanto, é possível que estes vírus apresentem características adaptativas para infectarem exclusivamente monocotiledôneas.

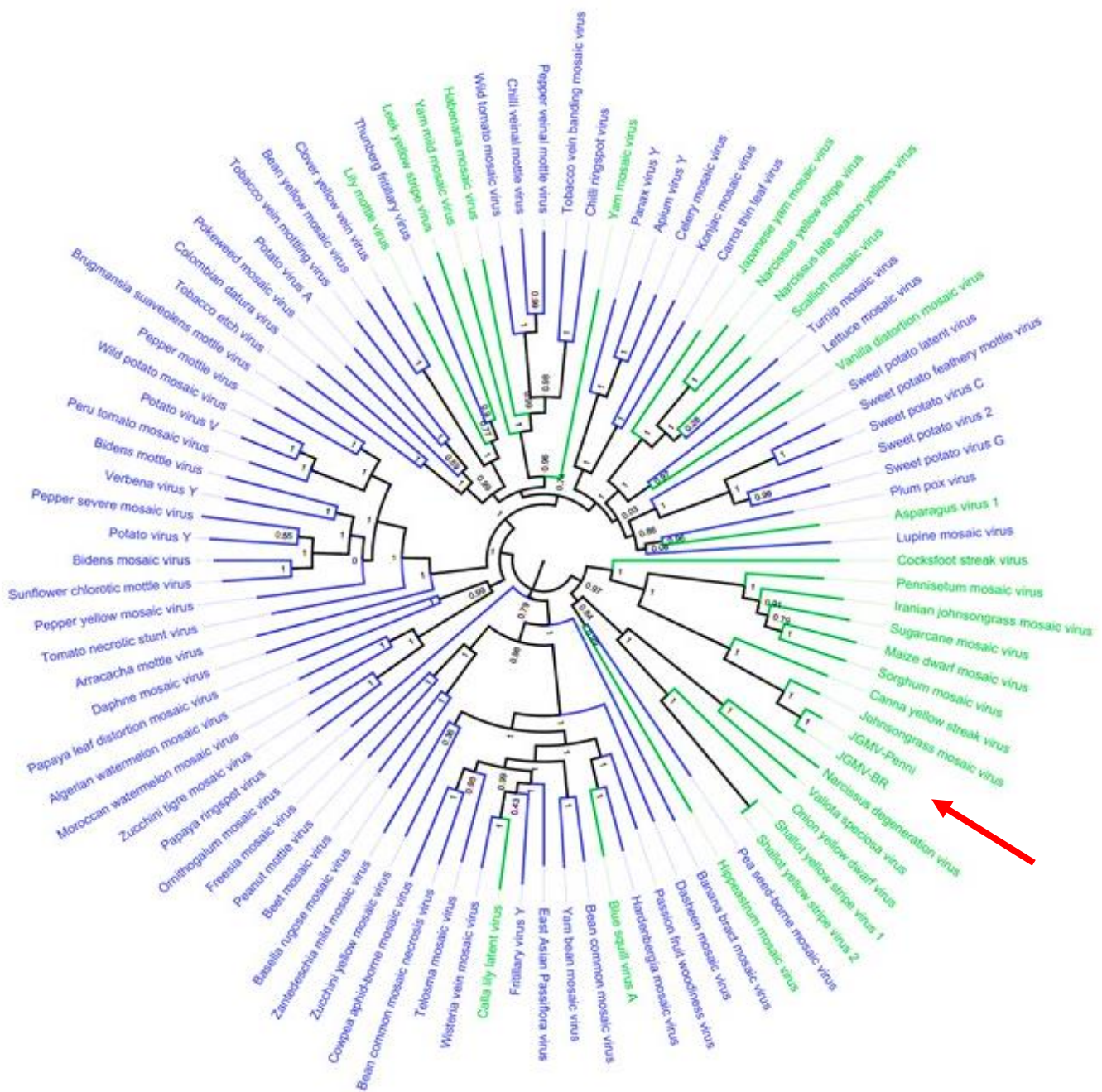


Figura 2.10: Árvore filogenética utilizando a sequência nucleotídica da poliproteína do JGMV e de outros *Potyvirus* depositados no GenBank. Os isolados JGMV-BR e JGMV-Penni estão indicados por seta vermelha. A cor verde representa os vírus que infectam monocotiledóneas, e a cor azul representa os vírus que infectam dicotiledôneas.

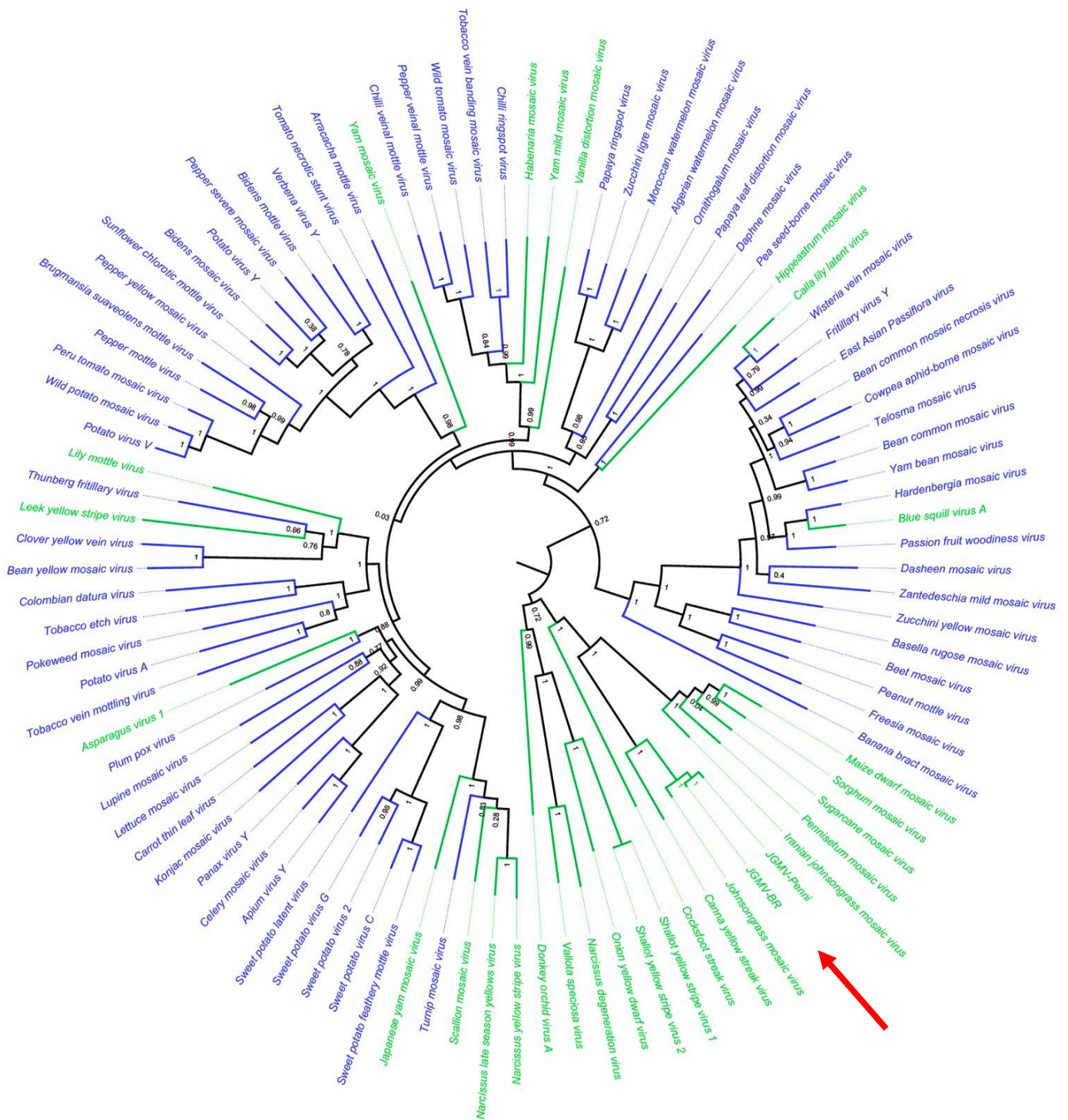


Figura 2.11: Árvore filogenética utilizando a sequência peptídica da poliproteína do JGMV e de outros *Potyvirus* depositados no GenBank. Os isolados JGMV-BR e JGMV-Penni estão indicados por seta vermelha. A cor verde representa os vírus que infectam monocotilédoneas, e a cor azul representa os vírus que infectam dicotilédoneas.

3.8. Amplificação e clonagem de JGMV por RT-PCR das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho.

Considerando que foi feita uma amostra composta de amostras de RNA extraídos de *Panicum* e *Brachiaria* apresentando sintomas de vírus, após o sequenciamento com a plataforma Illumina HiSeq 2000, houve a necessidade da identificação do JGMV em todas as plantas utilizadas neste sequenciamento, que estão descritas na Tabela 2.1. No caso do isolado JGMV-Penni, a detecção e clonagem já haviam sido realizadas, conforme descrito no item 3.3.

A detecção e identificação de JGMV potencialmente infectando *Panicum* spp. e *Brachiaria* spp., foi realizada utilizando-se os primers específicos JG9,413-R e JG8,352-F sintetizados a partir das sequências completas obtidas com o sequenciamento de alto desempenho. Com isso, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 1,06 kb, correspondendo a parte C terminal da proteína Nib e a proteína da capa (CP) (Figura 2.12) visualizados em gel de agarose 1% (Figuras 2.13 e 2.14).

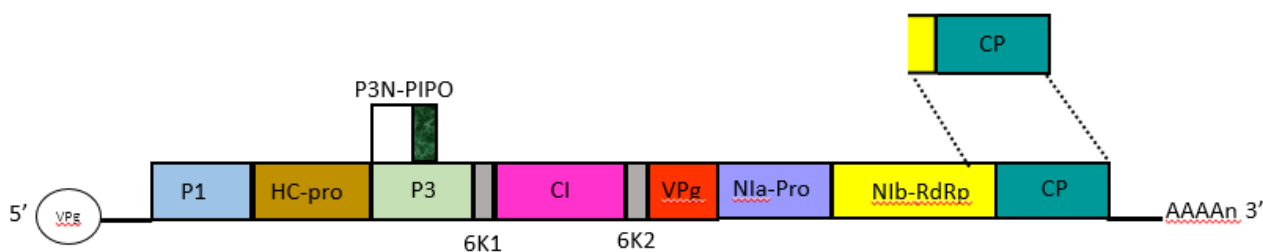


Figura 2.12: Representação esquemática da organização genômica dos *Potyvirus*. Indicação da região amplificada pelos primers JG9,413-R e JG8,352-F

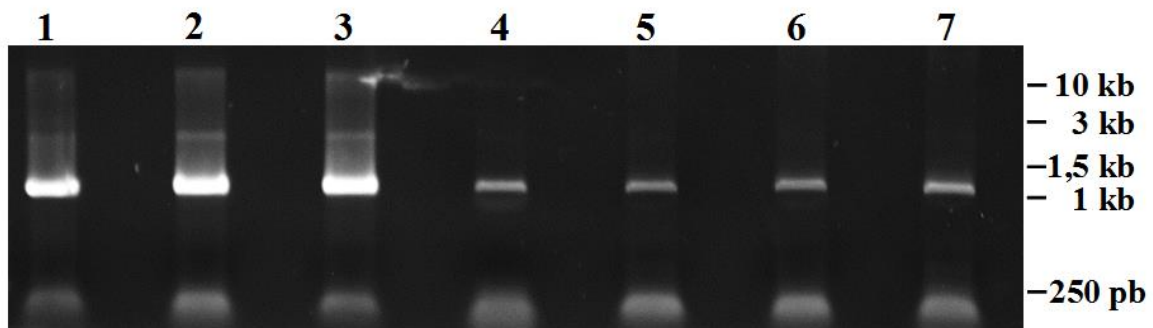


Figura 2.13: Detecção de JGMV por RT-PCR das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho: 1. PM-09/2013; 2. PM-19/2004; 3. PM-207; 4. PMI18/2009; 5. BB- B138; 6. BH-H6; 7. HB, amplificação de um fragmento de 1,06 kb

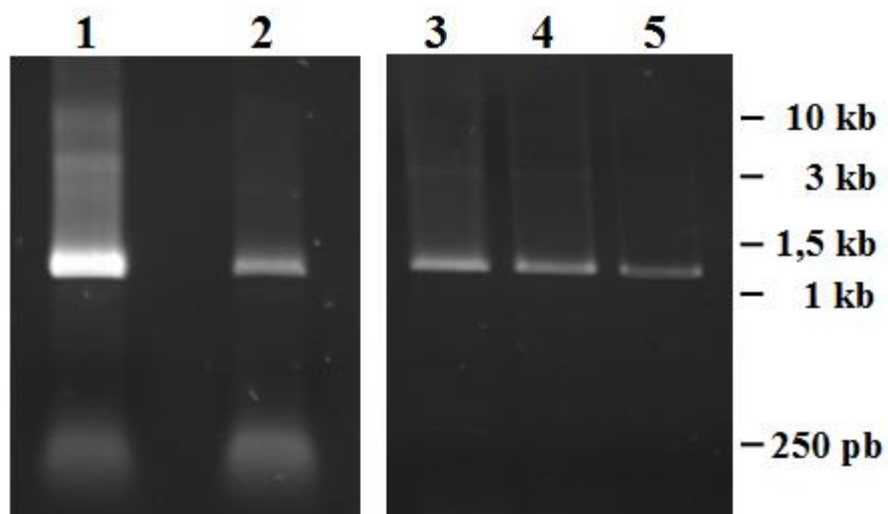


Figura 2.14: Análise do produto de PCR em gel de agarose 1% mostrando o produto específico de JGMV em *Panicum spp.* e *Brachiaria spp.* 1: PM-H8; 2: B- S73=3022; 3, 4 e 5: B-836.

Os fragmentos de aproximadamente 1,06 kb amplificados por RT-PCR foram clonados no vetor pGEM-T Easy. Várias colônias brancas foram obtidas como resultado da transformação por eletroporação. Cinco colônias brancas foram isoladas individualmente, das quais o DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. Após a digestão enzimática, pode-se observar que ocorreu a liberação do fragmento de 1,06 kb correspondente ao DNA clonado (Figuras 2.15, 2.16, 2.17, 2.18, 2.19, 2.20, 2.21 e 2.22), sendo assim identificados o JGMV em todas as plantas de *Panicum* spp. e *Brachiaria* spp. utilizadas no NGS. Entretanto, alguns isolados de JGMV apresentaram perfis de digestão diferentes, como foi o caso da amostra PM-207 e a amostra HB (Figura 2.13) que apresentaram um sitio de restrição da enzima *EcoRI*. Todas as colônias que apresentaram bandas de aproximadamente 1,06 kb foram selecionados e os fragmentos sequenciados com os primers T7 e SP6.

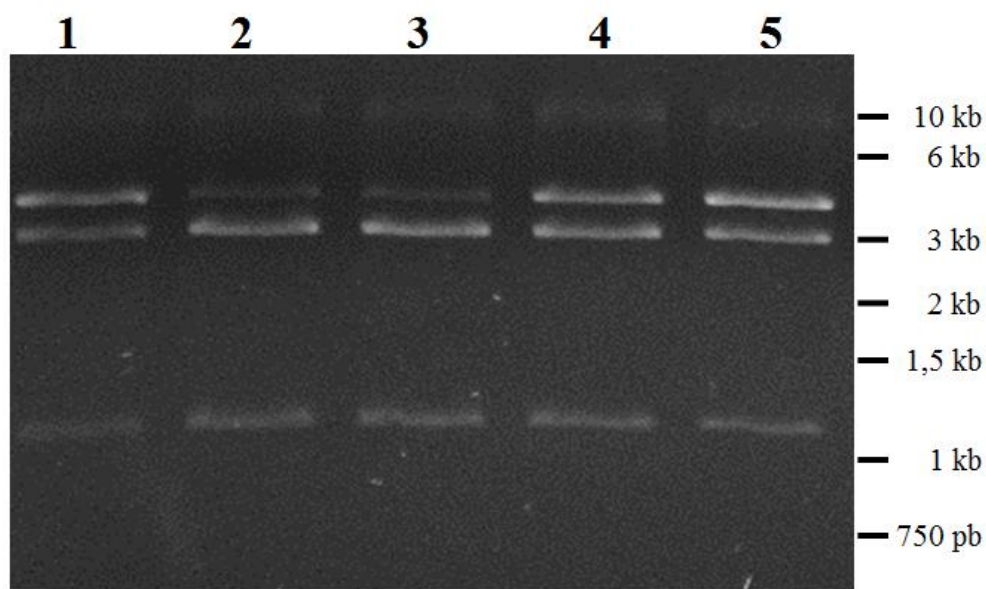


Figura 2.15. Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PM-09/2013. Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones 1, 2, 3, 4 e 5 de JGMV. Liberação do fragmento de 1,06 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

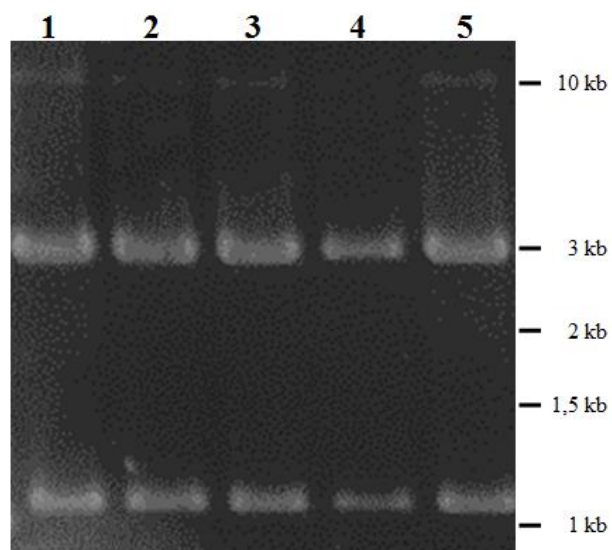


Figura 2.16. Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PM-19/2004. Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones 1, 2, 3, 4 e 5 de JGMV. Liberação do fragmento de 1,06 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

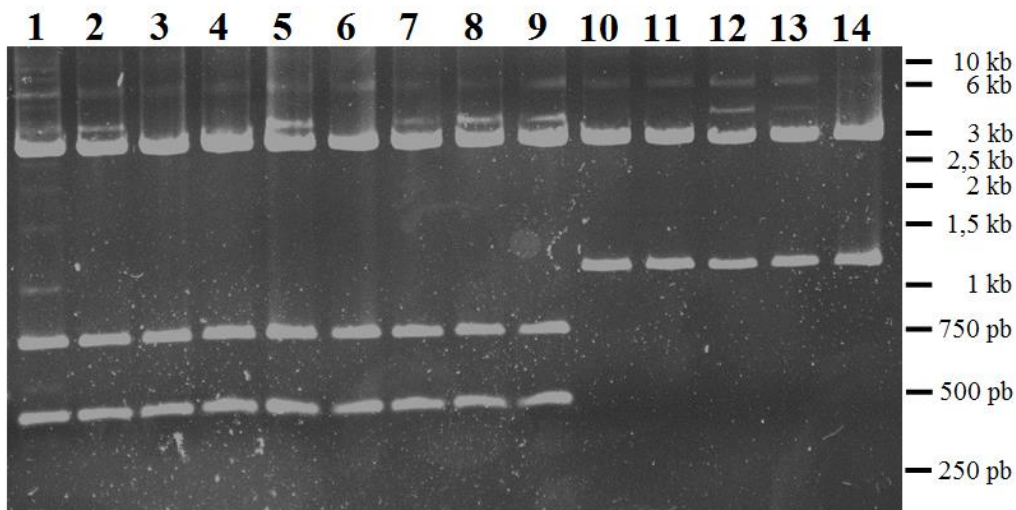


Figura 2.17. Confirmação de clonagem da CP de JGMV dos acessos PM-207, HB, B-S73=3022. Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones de 1 a 14 de JGMV originários das plantas de PM-207 (1-4); HB (5-9) e B-S73=3022 (10-14). Liberação do fragmento de 1,06 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

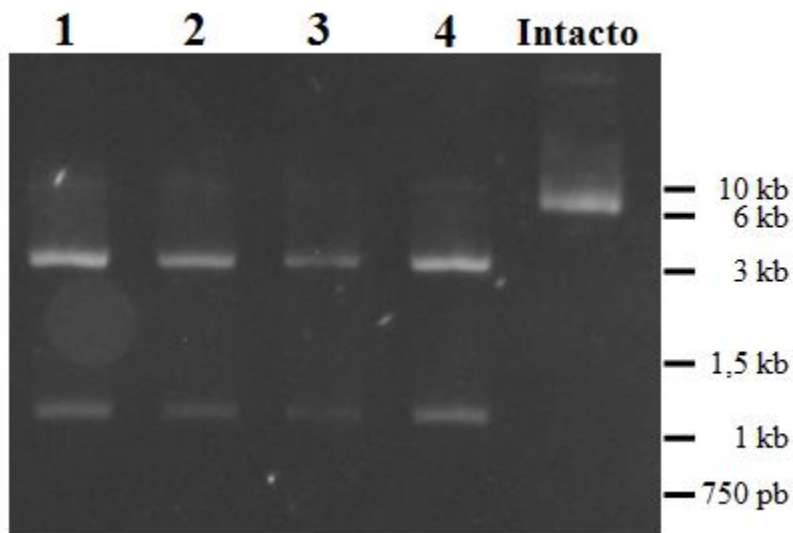


Figura 2.18: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PMI-18/2009 Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones 1, 2, 3, 4 e 5 (não digerido) de JGMV. Liberação do fragmento de 1,06 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

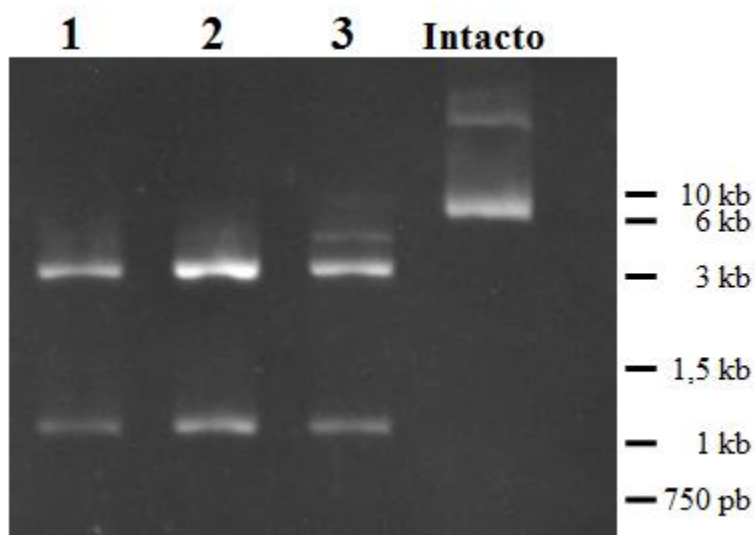


Figura 2.19: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso BH-H6. Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones 1, 2, 3, 4 (Não digerido), de JGMV. Liberação do fragmento de 1,06 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

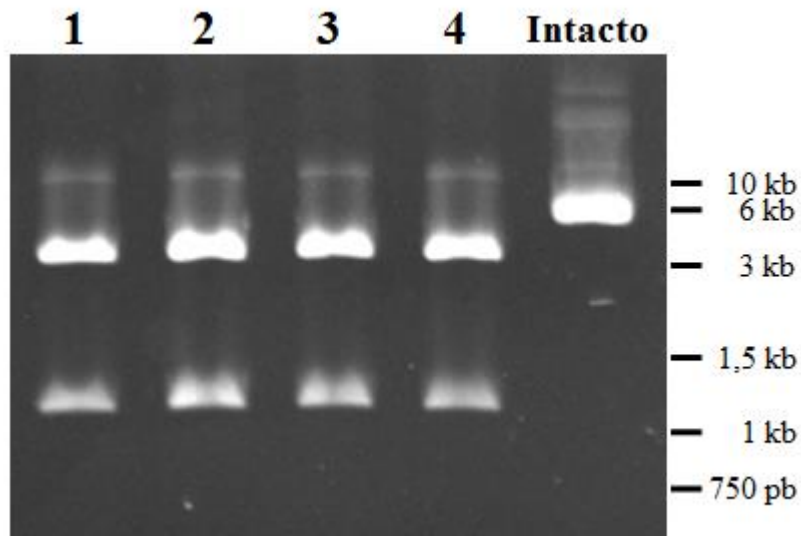


Figura 2.20: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso PM-H8. Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones 1, 2, 3, 4 e 5 (não digerido) de JGMV. Liberação do fragmento de 1,06 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

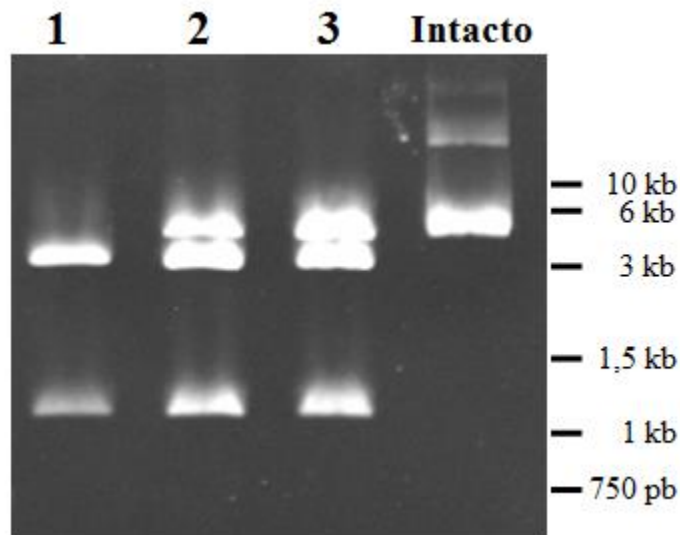


Figura 2.21: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso B-836. Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones 1, 2, 3 e 4 (não digerido) de JGMV. Liberação do fragmento de 1,06 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

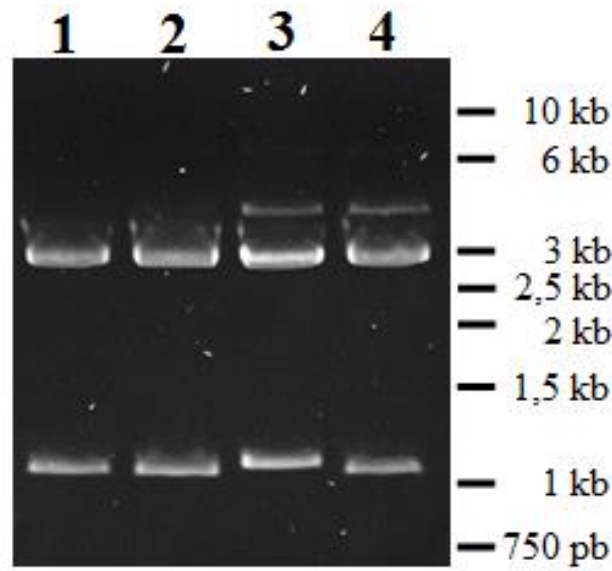


Figura 2.22: Confirmação de clonagem da CP de JGMV do acesso BB-138. Digestão com endonuclease de restrição *EcoRI* dos clones 1, 2, 3 e 4, de JGMV originário da planta de BB-138. Liberação do fragmento de 1,06 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

3.9. Análise filogenética utilizando a capa proteica.

Para avaliar a diversidade genética de JGMV, a partir dos 11 acessos utilizados no NGS (5 de *Panicum*, 1 de *Pennisetum* e 5 de *Brachiaria*), o fragmento gênico incluindo a CP foi amplificado (1060 pb) e clonado, de 3 a 5 clones de cada acesso avaliado, foram sequenciados. A Figura 2.23 mostra a matriz de comparação das sequências nucleotídicas da CP (Tabela 2.1), incluindo sequências da CP dos isolados australianos e americano. Esta matriz demonstra que os isolados brasileiros variam de 77 a 82% em relação aos isolados australianos e americanos. Com base na sequência nucleotídica da CP dos isolados de JGMV brasileiros, foi observado uma variação de 89 a 99% entre os mesmos, sendo também observada a presença de 2 grupos, um grupo no qual a identidade nucleotídica variou de 95 a 99%, e outro grupo que variou de 89 a 91%, correspondente aos isolados pertencentes ao acesso PM-H8. O menor valor de identidade nucleotídica apresentada está entre as sequências dos clones PM-H8-2 e B836. Ao comparar os isolados australianos com

eles mesmos, foi observado que a identidade nucleotídica variava de 95 a 99%, apresentando assim, uma menor diversidade viral quando comparados com os isolados brasileiros. Apesar disso, ao comparar a identidade de aminoácidos, nota-se que os valores de identidade variaram de 96 a 100%. O valor mais baixo de identidade de aminoácidos foi encontrado entre os clones PP-211 e PM H8-1, PP-211 e PM H8-2, PM-09/2013 e PM H8-1, B-S732=3022-2 e PM H8-2, e os clones 100% idênticos foram HB-1 e PM-207, BH-H6 e B-836-3, BH-H6 e HB-3, B-836-3 e BH-H6-1, B-836 e HB-3, BB-B138 e PM 09/2013, BB-B138 e PM 19/2004, BB-B138 e PMI 18/2009.

A análise filogenética das 40 sequências nucleotídicas codificadoras de CP dos isolados brasileiros e de outras disponíveis no banco de dados (GenBank) indica a presença de ao menos duas linhagens de JGMV, uma circulando nos EUA/Austrália e outra no Brasil, sugerindo uma única entrada do vírus em nosso país (Figura 2.24). Observando detalhadamente a distribuição filogenética dos isolados brasileiros, um determinado isolado de JGMV foi encontrado em 5 acessos diferentes, PM-19/2004 (3 clones), PMI-18/2009 (4 clones), PM-09/2013 (4 clones), BB-138 (4 clones) e B-S73=3022 (1 clone), num total de 16 sequências de CP que agruparam em um único clado, indicando uma ampla distribuição encontrada nesse estudo preliminar. O acesso PM-H8 apresentou um isolado exclusivo de JGMV com 4 clones, pois este isolado agrupou em um clado diferente na árvore filogenética quando comparado aos demais. Já os acessos B-836, HB, BH-H6, mostraram 2 isolados distintos e o acesso B-S73=3022 demonstrou 3 isolados de JGMV distintos, que agruparam com isolados oriundos da planta PM-19/2004, BB-138, PMI-18/2009, PM-09/2013 e BH-H6.

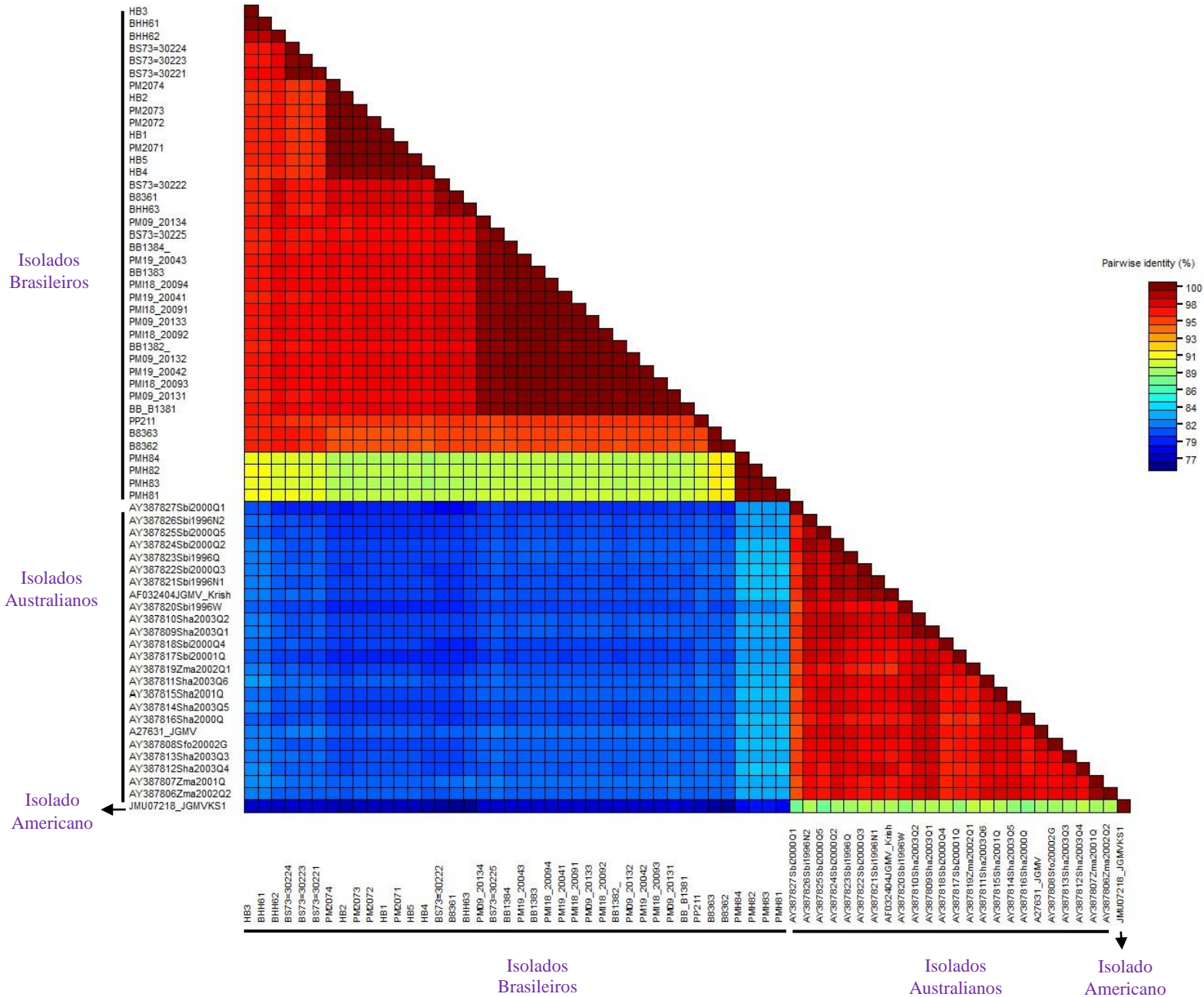


Figura 2.23: Matriz de comparação das seqüências da capa proteica dos clones isolados das plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho (Tabela 2.1) com isolados de JGMV da Austrália e EUA depositados no GenBank. O valor do grau de identidade entre as seqüências é dado em porcentagem

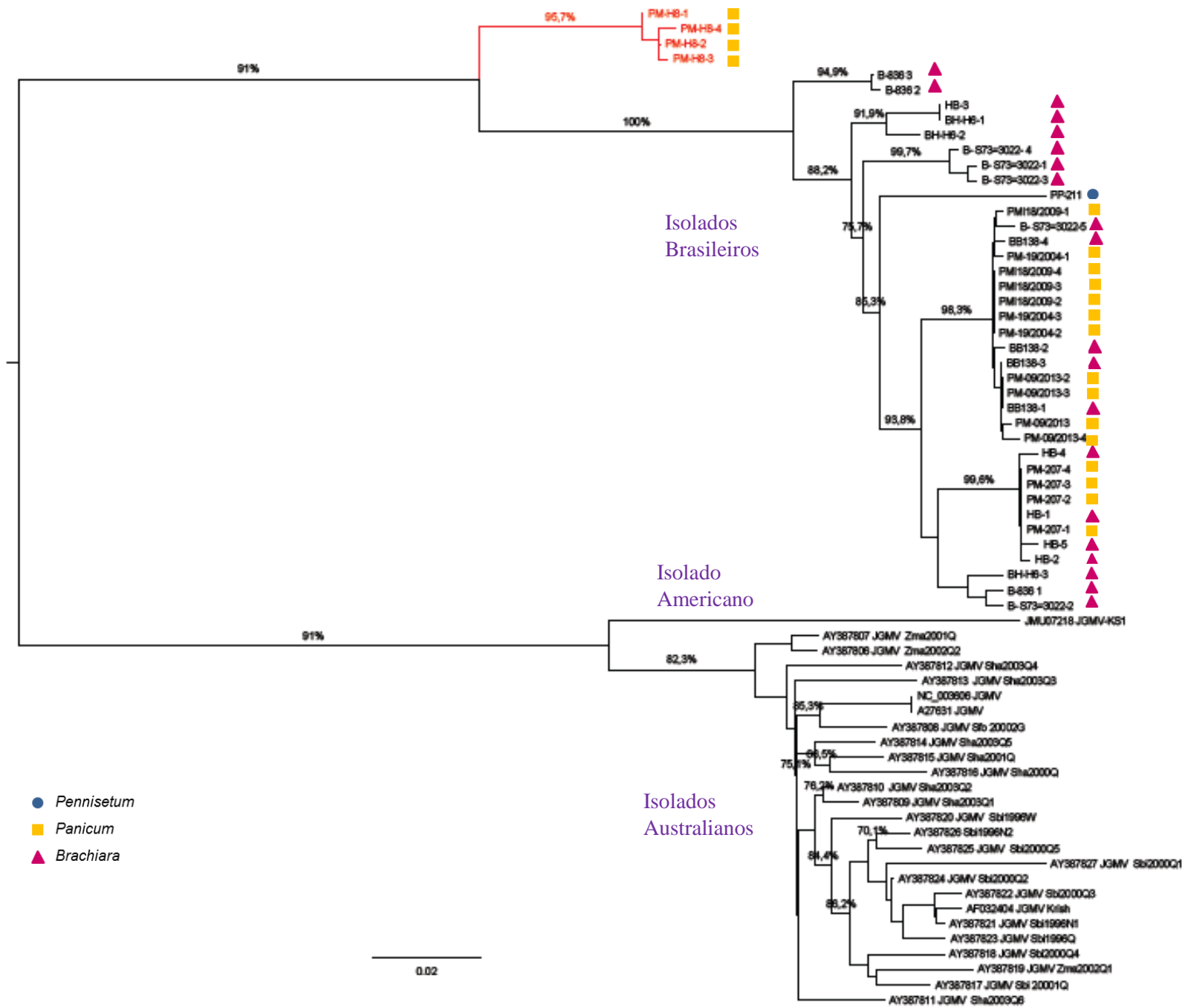


Figura 2.24: Análise filogenética da capa proteica. Diversidade de isolados de JGMV brasileiro, australiano e americano com base na sequência nucleotídica codificadora da CP.

4. Discussão

Recentemente tem sido observada uma alta incidência de sintomas típicos de vírus, como mosaico, amarelecimento e nanismo, em diversas plantas forrageiras em áreas experimentais da Embrapa Gado de Corte em Mato Grosso do Sul, mas também da Embrapa Gado de Leite. Aliado a esse problema, pouco é conhecido a respeito de infecções virais em plantas forrageiras no Brasil, evidenciando a importância do presente trabalho de dissertação.

A partir de um acesso de *Pennisetum purpureum* com sintomas de mosaico coletado na Bahia, foram observadas partículas virais características de *Potyviridae* (SHUKLA et al., 1994; FAUQUET et al., 2005; ADAMS et al., 2011), por meio de microscopia eletrônica. A partir dessa evidência de infecção viral ser responsável pelo sintoma de mosaico, foi realizado um sequenciamento de alto desempenho, que resultando no genoma de um isolado de *Johnsongrass mosaic virus*, denominado JGMV-Penni, com base na análise da sequência do genoma em estudo, e no critério de demarcação de espécie descrito por ADAMS et al. (2005b). Com esses dois resultados foi realizado o primeiro relato de JGMV no Brasil (SILVA et al., 2013).

O gênero *Potyvirus* representa um dos grupos de vírus de plantas mais importantes economicamente e amplamente distribuídos no mundo. Recentemente, estudos de metagenômica têm detectado vírus infectando plantas silvestres (ROOSSINCK, 2012). O fato dos *Potyvirus* serem altamente disseminados se deve, provavelmente, à ativa migração de pulgões vetores. Considerando que cada espécie de *Potyvirus* pode ser transmitida por muitas espécies de afídeos e, por outro lado, cada uma das espécies de afídeos pode transmitir diversas espécies de *Potyvirus*, a disseminação é agravada, tornando ainda mais difícil o controle e prevenção de infecções causadas por *Potyvirus* na agricultura (IVANOV et al., 2014; GIBBS et al., 2008).

Numa segunda etapa do trabalho, um segundo sequenciamento de alto desempenho foi realizado com amostras de 11 acessos de *Panicum* spp. e *Brachiaria* spp com sintomas de mosaico, coletados no Mato Grosso do Sul. Devido à diversidade de sequências encontradas na montagem usando ferramentas de bioinformática, um genoma consenso foi obtido, denominado JGMV-BR, representando uma população de diferentes isolados ocorrendo em campo. A diversidade de isolados foi estudada a partir de sequências da CP na terceira etapa dessa dissertação.

4.1. Caracterização molecular de JGMV-Penni e JGMV-BR

O sequenciamento de alto desempenho (NGS) possibilitou a elucidação de uma sequência genômica completa e uma parcial de dois isolados brasileiros de JGMV. Os resultados demonstraram que o genoma apresenta RNA de 9.828 nt de extensão, excluindo a cauda poliA, para o isolado JGMV-BR e o isolado JGMV-Penni apresenta RNA de 9.649 nt de extensão, excluindo 5'UTR e poliA. A partir dessas sequências genômicas, foram identificadas as ORFs codificadoras de poliproteína de 3.058 aminoácidos (aa), além da ORF curta, resultante de mudança de fase de leitura do ribossomo, que resulta na fusão P3-PIPO, compreendendo uma proteína 90 aa para ambos os isolados. Pelas análises das sequências das poliproteínas dos dois vírus, foi possível deduzir os resíduos de aminoácidos presentes em cada sítio de clivagem e identificar os motivos conservados nas sequências de cada proteína viral.

A proteína P1, sendo a primeira proteína madura de todos os *Potyvirus*, é a mais variável e menos conservada do genoma (ADAMS et al., 2005b), por isso apresentou a menor porcentagem de identidade nucleotídica em relação as demais proteínas quando comparada com outros *Potyvirus* mais relacionados, que variaram de 34 a 76% para o isolado de JGMV-BR e de 33 a 76% para o isolado JGMV-Penni. Entretanto, a porção C-Terminal é menos variável, apresentando resíduos e motivos conservados envolvidos na atividade proteolítica de serina protease. Esta proteína é responsável pela clivagem da junção P1/HC-Pro, tendo sido identificada na sequência de JGMV os sítios de clivagem KQICHY/S (JGMV-BR) e KQIKHY/S (JGMV-Penni) (Tabela 2.7) e os resíduos conservados de tirosina (Y) na posição 1 e serina (S) na posição -1. Como descrito por ADAMS et al (2005b), os resíduos conservados na posição 2 de histidina (H) que possui propriedades aromáticas e altamente hidrofóbicas, e foram identificados nos dois isolados, bem como, os motivos H₁₅₄-X₈-D₁₆₂-G₁₉₅-X-S₁₉₇-G₁₉₈ e F₂₁₀IIRGR₂₁₅, responsáveis pelas atividades auto proteolítica da P1 (VERCHOT et al., 1992 VERCHOT et al.,1991). Este último motivo, o F₂₁₀IIRGR₂₁₅ mostrou ser diferente do JGMV australiano já descrito na posição -4, que em vez de ser uma valina (V), é uma isoleucina (I) nos dois isolados brasileiros. Este motivo já foi descrito para o vírus *Pennisetum mosaic virus* (DENG et al., 2008). A diferença no sítio de clivagem da P1 do JGMV-Penni para o JGMV australiano (GOUGH e SHUKLA, 1993) e para o isolado JGMV-BR é na posição 3 do sítio de clivagem que contém uma lisina (K-Lys), sendo que, nos outros isolados, no australiano e no JGMV-BR é uma cisteína (C-Cys).

A proteína HC-Pro, por sua vez, é uma proteína bastante estudada, por apresentar a importante função de supressora do silenciamento gênico (MAIA et al., 1996; ANANDALAKSHMI et al., 1998). Assim como outras proteínas virais, a HC-Pro desempenha outras funções, como por exemplo, a de protease e também por ser responsável pela transmissão da partícula viral por afídeos. Esta proteína possui a atividade comprovadamente em *cis*. No C terminal da HC-Pro está presente um sítio ativo de cisteína protease que age sobre a junção HC-Pro/P3, sendo o sítio entre os resíduos de glicina (G/G), o mais conservado entre todos os sítios de clivagem do gênero *Potyvirus* (ADAMS et al., 2005b). Os resíduos de tirosina (Y), valina (V) e glicina (G), foram encontrados na posição 4, 2, 1 e -1 dos dois isolados no contexto KEYIVG/G (JGMV-BR) e KEYMVG/GD (JGMV-Penni). Além desses motivos, outros motivos foram encontrados sendo essenciais para a transmissão do vírus pelo seu inseto vetor, o motivo PTK_{552 e 549} que estabelece a ligação entre as proteínas HC-Pro e CP (motivo DAG), foi encontrado no genoma dos dois JGMV brasileiros, entretanto, o motivo KITC envolvido na interação da partícula viral com o estilete (BLANC et al., 1998) foi encontrado somente no isolado JGMV-BR. Sugere-se que a ausência deste motivo no isolado de JGMV-Penni pode ser devido ao modo de propagação vegetativa desta planta ser feito por mudas, e devido a várias multiplicações vegetativas modificações ou perdas de domínios envolvidos na interação vírus vetor podem ocorrer. Os motivos PTK na HC-Pro e o motivo DAG na CP juntos estabelecem a chamada *bridge hypothesis* (BERGER e PIRONE, 1986; AMMAR et al., 1994; WANG et al., 1996; BLANC et al., 1997), em que a HC-Pro media a ligação entre a partícula viral e o estilete do afídeo através de dois domínios, um de ligação a CP do vírus e o outro de ligação a receptores do aparelho bucal do vetor (PIRONE e BLANC, 1996). Sendo a HC-Pro uma proteína multifuncional, além das funções de supressão do silenciamento gênico, processamento da poliproteína e transmissão por afídeo, esta proteína também está relacionada ao processo de amplificação do genoma, no movimento sistêmico do vírus e na expressão dos sintomas (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). Nesse contexto, os motivos conservados IGN, por exemplo, importantes na amplificação do genoma e no movimento sistêmico do vírus não foram encontrados em nenhum dos isolados, bem como, o motivo FRNK associado à supressão de silenciamento gênico e expressão de sintomas, porém, o motivo CSC₅₃₄ envolvido no movimento viral foi localizado na proteína nos dois isolados de JGMV.

As demais proteínas são clivadas pela cisteína protease NIa-Pro em seus respectivos sítios de clivagem. Sendo esta a protease mais bem estudada, atua tanto em *cis* como em *trans*, e apresenta, em sua grande maioria, a sequência conservada XX(V/G)XX(Q/E)/(S/G/A) (ADAMS et al., 2005b).

A proteína P3 é liberada pela clivagem da junção P3/6k1, e foi encontrada no contexto TEVEHE/RK para ambos os isolados, o mesmo encontrado para o JGMV da Austrália (GOUGH e SHUKLA, 1993). Esta proteína já foi encontrada associada com as proteínas CI (RODRIGUEZ-CEREZO et al., 1993) e Nib (LANGENBERG E ZANG, 1997), as quais estão envolvidas na replicação viral e na expressão de sintomas (URCUQUI-INCHIMA ET AL., 2001). O resíduo V (valina) na posição 4, e E (ácido glutâmico) na posição 1 do sítio de clivagem já foi relatado em *Pennisetum mosaic virus* (DENG et al., 2008), *Sugarcane mosaic virus* (FAN et al., 2003) e no *Johnsongrass mosaic virus* australiano JGMV (GOUGH e SHUKLA, 1993)

As proteínas 6k1 e 6k2 não são utilizadas como critérios taxonômicos na delimitação de novas espécies dentro da família *Potyviridae* (ADAMS et al., 2005a). São proteínas pouco estudadas, portanto, não há relatos quanto a presença de resíduos de aminoácidos ou motivos conservados nas sequências destas proteínas, a não ser os motivos já mencionados como característicos da protease NIa-Pro. Essas proteínas quando clivadas nas junções 6k1/CI e 6K2/NIa-Pro, liberam as duas proteínas (6k1 e 6k2) com massa molecular de 6kDa cada uma (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). Os dados sobre a função da proteína 6k1 ainda são limitados para explicar sua funcionalidade, entretanto, sugere-se que esta proteína pode estar envolvida, juntamente com a P3, na patogenicidade e replicação do genoma viral (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). A proteína 6k2, apesar de não possuir uma função enzimática estabelecida, foi já comprovada, que esta proteína possui um domínio hidrofóbico central de ligação com membranas (SACHAAD et al., 1997). A proteína se associa aos compartimentos vesiculares decorrentes do retículo endoplasmático. Com isso, foi proposto que a proteína 6k2 é necessária para a amplificação do genoma e ancora o complexo replicativo às membranas (WEI e WANG, 2008; URCUQUI-INCHIMA et al., 2001; SCHAAD et al., 1997). Os sítios de clivagem para a proteína 6k1 encontrado foi o mesmo para dois isolados em estudo EVKHEG/SQ, e diferente daquele já descrito para JGMV (QEVKHE/G). Para a proteína 6k2 os sítios encontrados foi TEVEHE/G, o mesmo para os dois isolados, sendo idêntico ao já descrito para JGMV australiano (TEVEHE/G) (GOUGH e SHUKLA, 1993).

A proteína indutora de inclusão citoplasmáticas do tipo cata-vento desempenha a atividade de helicase e está envolvida no movimento célula-a-célula (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). Esta é liberada pela clivagem da junção CI/6k2, e o sítio de clivagem apresentado pelos dois isolados foi ENVCKE/L, diferente na posição -1 em relação à sequência conservada relatada na literatura, na qual foi observada a ocorrência de uma leucina (L) ao invés de um resíduo de serina (S), glicina (G) ou alanina (A) (CARRINGTON et al., 1993). Os motivos conservados, GXXGXGKS, envolvidos na ligação da CI à nucleotídeos trifosfatos (NTP) foram encontrados na posição 1184 a 1192 nos dois isolados (KADARE e HAENNI, 1997), assim como, os aminoácidos conservados DECH (posição 1273-1277), VATNNIIENGVTL (posição 1417-1429) e GERVQRLGRVGR (posição 1461-1473), que são característicos de proteínas com atividade helicase e podem estar envolvidos na hidrólise de ATP, que foram também encontrados nos dois isolados situados nas mesmas posições no genoma (RIECHMANN et al., 1992). A CI também é utilizada para critérios taxonômicos na delimitação de novas espécies dentro da família *Potyviridae*, e considera-se que 78,3% de identidade nucleotídica é o limiar para o critério de demarcação de nova espécie (ADAMS et al., 2005a). Neste sentido a identidade de nucleotídeo da CI variou de 53 a 84% para os dois isolados, quando comparados aos vírus mais relacionados descritos nas Tabelas 2.5 e 2.6. Com isso, os dois isolados em estudo estão acima do limiar de demarcação de nova espécie, pois a maior identidade foi de 84% com o JGMV australiano (NC_003606) depositado no GenBank. Esses dados confirmam que os isolados em estudos pertencem à espécie *Johnsongrass mosaic virus*.

NiA-Pro caracteriza-se por apresentar dois domínios, um domínio que refere-se a proteína VPg-NiA na porção N-terminal e outro que refere-se a protease NiA-Pro na porção C-terminal. A liberação da proteína VPg-NiA ocorre da clivagem da junção em *trans* pela protease NiA-Pro na qual é liberada pela sua atividade de autoclivagem *cis* sob a junção NiA-Pro/NiB (RIECHMANN et al., 1992; ADAMS et al., 2005b). A presença do aminoácido ácido glutâmico (E) na posição 1 tem sido relacionado a lenta proteólise nos dois domínios de NiA, pois segundo SCHAAD et al., (1996), a clivagem interna entre os dois domínios relacionados com a NiA ocorre de maneira lenta, e que muitas vezes resulta na separação parcial dos domínios, sugerindo que a NiA possui uma função regulatória. A análise da sequência do sítio de clivagem de NiA em JGMV revelou a presença deste resíduo, encontrado no contexto PEVEHE/G, como é relatado na literatura (SCHAAD et al., 1996; ADAMS et al., 2005b) sendo o mesmo sítio de

clivagem relatados para o JGMV (GOUGH e SHUKLA, 1993). Assim, como a HC-Pro e a CI, sugere-se a utilização da sequência da proteína NIa-Pro no critério de demarcação de nova espécie, por exibirem padrões comparados aos de ORF completa (ADAMS et al., 2005a). Neste sentido, o maior valor encontrado de identidade nucleotídica foi com o JGMV australiano de 85% com o JGMV-BR e de 84% com o JGMV-Penni, estando acima do limiar de 77,5% estabelecido para separação de espécie (ADAMS et al., 2005 a).

A proteína NIb é um dos produtos gênicos mais conservados entre os *Potyvirus*. Representa a polimerase (RNA polimerase dependente de RNA-RdRp) viral, e por isso possui a função principal de síntese de novas cópias de RNA (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001; LAIN et al., 1990). Liberada pela clivagem da junção NIb/CP, na qual ocorre no contexto ERVSNE/AS para o isolado JGMV-BR e ERISNE/AS para JGMV-Penni, possui uma diferença na posição 4 do sítio de clivagem de JGMV-BR, que é um resíduo de valina em vez de ser uma isoleucina (I) que está presente tanto no isolado JGMV-Penni como no JGMV australiano (GOUGH e SHUKLA, 1993). Foi possível identificar em sua sequência, resíduos de aminoácidos e motivos conservados, por exemplo, oSLKAEI₂₄₀₇ necessários para a atividade da RNA polimerase e ADGSQFD₂₄₈₅ para a ligação de NTP, foram localizados nas proteínas. Ademais, o motivo característico das RdRp's, encontrado na grande maioria das poliproteínas virais, o GDD (WANG e GILLAM, 2001; URCUQUI-INCHIMA et al., 2001), como descrito na literatura, foi também encontrado na posição 2.585 no genoma dos dois isolados brasileiros de JGMV.

A proteína mais representativa utilizada em critérios taxonômicos é a proteína da capa proteica (CP). Antes do advento de dados de sequência, as espécies e estirpes eram distinguidas com dificuldade usando o critério da gama de hospedeiro, sintomatologia e sorologia. Contudo, a disponibilidade de sequências da proteína do capsídeo e do genoma completo tem ajudado a esclarecer e aperfeiçoar a taxonomia no gênero. Tal parâmetro permitiu o estabelecimento do critério baseado na CP que pode ser usado para distinguir sequências de espécies de vírus relacionados, daqueles que são estirpe da mesma espécie (ADAMS et al., 2005b). Segundo SHUKLA e WARD (1988) existem três razões para se utilizar a CP como critério taxonômico: o primeiro critério é que a sequência de aminoácidos da CP tem pouca ou nenhuma homologia de sequência entre os diferentes grupos de vírus de planta, e que exceto a CP, todas as outras proteínas têm certa homologia com proteínas de outros grupos de vírus de plantas e vírus animais; o

segundo critério seria que a CP corresponde a aproximadamente 95% da massa da partícula viral e que esta é a proteína que pode ser obtida de forma suficientemente pura; a terceira seria que a sorologia reflete a estrutura da proteína da capa. Sendo assim, a CP vem sendo largamente empregada com essa finalidade e, portanto, o limiar estabelecido como critério de discriminação de espécie foi de 76-77% de identidade de nucleotídeos (ADAMS et al., 2005a). No nosso estudo é relevante destacar que baseado nos 77% de identidade de nucleotídeo do isolado de JGMV-BR e 78% de identidade do isolado JGMV-Penni e identidade de aminoácido de 80% para ambos, quando comparado ao JGMV da Austrália (NC_003606), portanto, os isolados brasileiros de JGMV em estudo, ficam no limiar estabelecido para a demarcação de espécies. Ressalta-se ainda que a proteína da capa está envolvida em várias funções, como a encapsidação do RNA viral, transmissão pelo vetor (SHUKLA e WARD, 1989; ATREYA et al., 1990; URCUQUI-INCHIMA et al., 2001), movimento célula a célula (KASTEEL et al., 1993; DOLJA et al., 1994) e caracteriza-se por apresentar regiões com diferentes níveis de conservação, sendo, dessa forma, dividida em domínios. Os domínios variáveis N-terminal e C-terminal estão relacionados com a capacidade de transmissão por afídeos, movimentos sistêmicos e de célula-a-célula (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). Nesse N-terminal está presente o motivo DAG, altamente conservado dentre os *Potyvirus* transmitidos por afídeos, estando presente nos dois isolados de JGMV na posição 2.754-2.757. Esses dados corroboram com os resultados de RYBICKI e SHUKLA (1992) e TEAKLE e GRILLS (1973) que indicam que os vetores de JGMV são *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum maidis*. Segundo LOPEZ-MOYA et al., (1999), os motivos DAG na CP e PTK na HC-Pro, estariam envolvidos na interação entre as duas proteínas, sendo assim, necessários para a transmissão de vírus. Além do motivo DAG presente nos dois isolados na posição 2.754-2.757, foram identificados também à presença das sequências conservadas MVWAIENGTSP e QMKAAA nos dois isolados nas posições 2.907-2.918 (JGMV-BR) e 3.010-3.015 (JGMV-Penni), respectivamente (RYBICKI e SHUKLA, 1992; SHUKLA et al., 1994). O domínio central da proteína do capsídeo está relacionado a encapsidação do RNA viral, sendo que a CP interage com o RNA no interior do vírion, formando subunidades de contato, necessárias para a montagem e estabilidade da partícula viral (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). Ressaltamos que a sequência de aminoácidos do N-terminal desta proteína dos dois isolados, é diferente da sequência de aminoácidos do JGMV depositada no GenBank.

Segundo SHUKLA et al., (1994), a alta variabilidade na CP tem sido implicada na determinação de proteção cruzada, gama de hospedeiro e virulência em estirpes de *Potyvirus*. Já foi relatado que as diferenças nas sequências de resíduos de aminoácidos do N-terminal da CP entre duas estirpes de JGMV são responsáveis por quebrar a resistência do gene Krish em plantas de sorgo (SURANTO et al., 1998). A análise das sequências de aminoácidos revelou dois resíduos que eram consistentemente diferentes entre isolados JGMV de plantas de sorgo que continham o gene Krish e os isolados de outros hospedeiros. Todos os isolados a partir de plantas de sorgo que continham o gene de resistência Krish, apresentavam resíduos de lisina e ácido aspártico nas posições 175 e 176, em comparação com dois resíduos de asparagina em isolados de hospedeiros que não possuíam o gene Krish. OH (2004) relatou que a resistência Krish foi quebrada quando ambos os resíduos 27 (ou valina ou ácido glutâmico) e 30 (treonina) foram alterados para alanina. Esta substituição aumentando a eficácia da hidrofobicidade da porção da extremidade N-terminal da CP, sugeriu que poderia ocorrer um mecanismo de mudança da estrutura terciária da região exposta do CP. Este mecanismo pode também ser o resultado da mudança observada no resíduo 176 de asparagina para ácido aspártico, que transporta uma carga negativa e torna-se mais hidrofóbica em condições ácidas. A substituição no resíduo 175 se dá entre dois aminoácidos hidrofílicos e, portanto, é menos provável que tenha um efeito significativo sobre a hidrofobicidade global da região N-terminal. A estrutura terciária do monômero de CP proposto por SHUKLA e WARD (1989) consiste em sete hélices e três *loops* com os N- e C-terminais projetados em direção a superfície das subunidades da CP. Os resíduos de 175 e 176 estão localizados entre o terceira e quarta hélices, o que significa que estes resíduos poderiam efetivamente estar expostos na superfície da subunidade da CP. Estes também estão próximos aos resíduos 27 e 30 identificados por OH (2004), em que a interação entre as duas regiões poderia estar causando a quebra de resistência do gene Krish em plantas de Sorgo. Entretanto, para confirmar este resultado, serão necessários mais trabalhos futuros com clones de cDNA infecciosos para explorar os mecanismos adicionais ou interações de aminoácidos através das quais a estirpe JGMV-Krish quebra a resistência Krish em plantas sorgo (OH, 2004).

Os dois isolados brasileiros apresentam 95% de identidade nucleotídica nessa região, indicando assim, a existência de características similares, porém, com certo grau de diversidade entre esses dois vírus.

A segunda ORF, que codifica uma proteína denominada de Pipo (Pretty Interesting *Potyviridae* ORF), foi primeiramente identificada em *Turnip mosaic virus*. Em uma primeira análise, essa ORF já foi encontrada em 48 genomas de referência de *Potyvirus* e começa em um motivo altamente conservado G₁₋₂A₆₋₇, sendo que não há um códon de terminação bem conservado na extremidade 3' terminal e os comprimentos finais das ORF's, a partir do motivo G₁₋₂A₆₋₇ variam entre os códons 60-115. Esta proteína encontra-se presente dentro do cístron da P3, tendo sido identificada entre os nucleotídeos na posição 2.737-3.038 no isolado de JGMV-BR e na posição 2.738-3.042 no isolado de JGMV-Penni no contexto G₁A₆, e para ambos, está em conformidade com o motivo conservado descrito na literatura (CHUNG et al., 2008). Atualmente, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de tradução envolvidos na expressão da PIPO e o seu papel no ciclo de vida dos *Potyvirus* (CHUNG et al., 2008). Contudo, estudos desenvolvidos por WEN e HAJIMORAD (2010), mostraram que após a introdução de mutações e a realização de *knock out* do gene, não se aboliu a replicação viral de *Soybean mosaic virus*, mas o vírus foi restringido a um pequeno número de células em folhas inoculadas de soja, sugerindo que a proteína pode estar envolvida no movimento viral (WEN e HAJIMORAD, 2010).

4.2. Diversidade de isolados de JGMV por sequência nucleotídica de CP

Objetivando compreender a diversidade de isolados e especificidade de hospedeiros, especialmente que compõe o JGMV-BR, e comparar com isolados que ocorrem em outros lugares do mundo, foram desenhados primers para amplificação do gene CP, que foram clonados e sequenciados num total de 40 clones observados.

A análise filogenética do gene da CP revelou a presença de um genótipo formado por sequências brasileiras e outro por sequências provenientes da Austrália e EUA. A diversidade genética presente nos isolados brasileiros de JGMV sugere que a introdução deste vírus no Brasil não é recente, e provavelmente ocorreu apenas uma vez. Tendo em vista a história destas culturas no Brasil, é provável que este vírus tenha sido introduzido no país a partir do continente africano, entretanto, a ausência de sequências de JGMV de isolados africanos impede uma avaliação mais profunda desta hipótese.

Numa análise preliminar dos isolados brasileiros, um determinado isolado de JGMV foi observado em 16 clones de 5 acessos, incluindo *Panicum* e *Brachiaria*, sendo amplamente distribuídos. Por outro lado, o acesso B-S73=3022 demonstrou até o

momento, a presença de 3 isolados de JGMV, e os acessos B-836, HB, BH-H6, mostraram 2 isolados distintos.

Considerando que esses vírus foram isolados de plantas que fazem parte do banco ativo de germoplasma da Embrapa Gado de Leite e Embrapa Gado de Corte, e que a Embrapa domina 85% do mercado de forrageira no Brasil, é possível que, práticas de condução dos programas de melhoramento, estejam colaborando na cadeia de disseminação deste vírus para outras regiões do país. Além disso, hospedeiros alternativos no campo, ainda não identificados, possam também estar contribuindo para a disseminação dessa população de isolados do JGMV nas condições brasileiras. Apesar de ausência de estudos sobre os impactos econômicos deste vírus em culturas forrageiras, é importante destacar que o JGMV faz parte do complexo de vírus que causam a doença do mosaico comum do milho. Portanto, a presença de alta diversidade genética de JGMV observada em plantas forrageiras, poderia facilitar a emergência de estipes mais severas de JGMV colocando em risco a cultura do milho no Brasil. Em países como EUA e Venezuela este vírus é um problema para esta cultura. Além disso, alta diversidade viral observada, associada a uma base genética estreita de forrageiras, dificulta o melhoramento genético voltado à obtenção de resistência a vírus. Além disso, no Brasil, a diversidade genética disponível nas coleções de germoplasma de forrageiras tropicais mais importantes é pouco conhecida.

Considerando que as linhagens de JGMV detectadas na Austrália, Estados Unidos e Venezuela infectam milho (*Zea mays*), dados preliminares de gama de hospedeiro dos isolados brasileiros não mostraram sintomas em quatro variedades de milho testadas em quatro bioensaios distintos (dados não mostrados). Essas observações sugerem que até o momento, as linhagens brasileiras são capazes de infectar plantas dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Pennisetum*, e que a diferença na filogenia, além de se correlacionar com a distribuição geográfica, pode representar também uma especificidade a esses hospedeiros.

A utilização do sequenciamento de alto desempenho para o estudo da diversidade de vírus e para a obtenção de genomas completos está se tornando um método eficiente no descobrimento de espécies virais. A detecção e identificação de novos vírus contam com uma grande variedade de técnicas, tanto tradicionais, como modernas. Embora bem sucedidas, as técnicas tradicionais apresentam algumas inconveniências, especialmente quando se tenta identificar patógenos desconhecidos, pois requerem uma predição do agente infeccioso, que na maioria das vezes, estes dados

são incompletos ou até mesmo ausentes. Com isso, uma das vantagens na utilização do sequenciamento de alto desempenho é a não necessidade do conhecimento prévio do agente infeccioso, além de permitir, a superação de problemas como erros na detecção de patógenos associados à inespecificidade de técnicas tradicionais de detecção viral. No entanto, no Brasil, esta ferramenta ainda é pouco utilizada, sendo o nosso grupo de pesquisa um dos pioneiros na utilização dessa técnica.

5. Considerações finais e perspectivas

Neste trabalho foi realizado o primeiro relato de JGMV infectando *Pennisetum*, *Brachiaria* e *Panicum* no Brasil. Dois isolados foram caracterizados molecularmente, um originário do sequenciamento de alto desempenho do combinado entre plantas de *Panicum* e *Brachiaria* e o outro do sequenciamento de plantas de *Pennisetum*. Além do JGMV, o *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) também foi detectado, o que poderia estar colaborando para a alta severidade de sintomas observados nessas plantas em campos de melhoramento genético da Embrapa Gado de Corte. Este vírus pertence à família *Secoviridae* do gênero *Waikavirus*, e é transmitido por cigarrinha e será estudado num futuro próximo.

Os estudos de filogenia baseados em sequências de CP demonstraram a existência de pelo menos duas linhagens de JGMV, uma nos EUA e Austrália e outra presente no Brasil. Considerando os isolados brasileiros, existe maior variabilidade que dentre os isolados australianos.

O estudo será continuado visando caracterizar biologicamente, estabelecendo a importância e impacto da infecção de isolados de JGMV em plantas forrageiras, já que representam uma ameaça potencial para outras plantas cultivadas, como por exemplo, milho, trigo, arroz, cevada e sorgo. As informações geradas serão utilizadas no Programa de Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras na Embrapa Gado de Corte, visando o desenvolvimento de linhagens resistentes a JGMV.

A determinação da gama de hospedeiros está sendo realizado para o melhor entendimento da epidemiologia destes vírus e da sua importância para a agropecuária do país. Futuramente, estudos de interação entre esses dois vírus com vetores e suas plantas hospedeiras serão realizados para o melhor entendimento desse novo tipo de interação.

6. Referências bibliográficas

- ABIEC. Brasil lidera ranking de exportação de carne bovina [online]. Disponível em: http://www.abiec.com.br/news_view.asp?id=%7BCAAACE975-B5D1-4337-9F3B580E7118CB45%7D, [Acesso 29 ago 2013], 2009.
- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol. Plant Pathol.*, v. 6, p. 471-487, 2005a.
- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch. Virol.*, v. 150, p. 459-479, 2005b.
- ADAMS, M. J.; ZERBINI, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. Virus Taxonomy. Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. New York: *Academic Press* 1327 p., 2011.
- AMMAR, E. D.; JARLFORS, U.; PIRONE, T. P. Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology*, v. 84, p. 1054-1060, 1994.
- ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G. J.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, A. A.; SMITH, T. H.; VANCE, V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc natl Acad sci*, v. 95, p. 13079-13084, 1998.
- ATREYA, C. D.; RACCAH, B.; PIRONE, T. P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, v. 178, n. 1, p. 161-165, 1990.
- BERGER, P. H.; PIRONE, T. P. The effect of helper component on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology*, v. 153, p. 256-261, 1986.
- BLANC, S.; LOPEZ-MOYA, J. J.; WANG, R.; GARCIA-LAMPASONA, S.; THORNBURY, D. W.; PIRONE, T. P. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a *Potyvirus*. *Virology*, v. 231, p. 141-147, 1997.
- BLANC, S.; AMMAR, E. D.; GARCIA-LAMPASONA, S.; DOLJA, V. V.; LLAVE, C.; BAKER, J.; PIRONE, T. P. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interaction with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.*, v. 79, p. 3119-3122, 1998.
- CARRINGTON, J. C.; HALDEMAN, R.; DOLJA, V. V. E.; RESTREPO-HARTWING, M. A. Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-

- proteinase (NIa) of tobacco etch *Potyvirus* in vivo. *J virol.*, v. 67, p. 6995-7000, 1993.
- CHEN J, CHEN J, ADAMS MJ. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Arch Virol.* 2001;146(4):757-66.
- CHUNG, B. Y.; MILLER, W. A.; ATKINS, J. F.; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proc Natl Acad Sci*, v. 105, p. 5897-5902, 2008.
- DENG, C. L.; WANG, W. J.; WANG, Z. Y.; JIANG, X.; CAO, Y.; ZHOU, ; WANG, F. R.; LI, H. F.; FAN, Z. F. The genomic sequence and biological properties of Pennisetum mosaic virus, a novel monocot-infecting potyvirus. *Arch Virol*, v. 153, n. 5, p. 921-927, 2008.
- DOLJA, V.V.; HALDEMAN, R.; ROBERTSON, N. L.; DOUGHERTY, W. G.; CARRINGTON, J. C. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch *Potyvirus* in plant. *Embo J*, v. 13, p. 1482-1491, 1994.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* New York: *Academic Press* 1259 p. 2005.
- FAN, Z. F.; CHEN, H. Y.; LIANG, X. M.; LI, H. F. Complete sequence of the genomic RNA of the prevalent strain of a potyvirus infecting maize in China. *Arch Virol.*, v. 148, p. 773-782, 2003.
- GIBBS, A. J.; OHSHIMA, K.; PHILLIPS, M. J.; GIBBS, M. J. The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PLoS ONE*, v. 3, e 2523, 2008.
- GOUGH, K. H.; SHUKLA, D. D. Nucleotide sequence of Johnsongrass mosaic *Potyvirus* genomic RNA. *Intervirology*, v. 36, p. 181-192, 1993.
- HOWELL, W. E.; THOMPSON, D.; SCOTT, S. Virus-like disorders of fruit trees with undetermined etiology. In *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*; HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, W. Eds.; The American Phytopathological Society Press: St. Paul, MN, USA, p. 259-265, 2011.
- HULL, R. M. *Plant Virology* 4th Ed. N.York, Academic Press, 2002.
- IVANOV, K. I.; ESKELIN, K.; LÖHMUS, A.; MAKINEN, K. Molecular and cellular mechanisms underlying *Potyvirus* infection, *Journal of General Virology*, v. 95, p. 1415-1429, 2014.

- KADARE, G.; HAENNI, A. L. Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.*, v. 71, p. 2583-2590, 1997.
- KARAN, M.; NOONE, D.F.; TEAKLEAD, D.S.; HACKER J. B. Susceptibility of pearl millet accessions and cultivars to Johnsongrass mosaic and sugarcane mosaic viruses in Queensland. *Australasian Plant Pathology*, v. 21, 1992.
- KASTEEL, D.; WELLINK, J.; VERVER, J.; VAN LENT, J.; GOLDBACH, R.; VAN-KAMMEN, A. The involvement of cowpea mosaic virus M RNA-encoded proteins in tubule formation. *J. Gen. Virol*, v. 74, p. 1721-1724, 1993.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics applications note*, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- LAIN, S.; RIECHMANN, J. L.; MARTIN, M. T.; GARCIA, J. A. Homologous *Potyvirus* and falvivirus proteins belong to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene*, v. 82, p. 357-362, 1990.
- LIU, S.; VIJAYENDRAN, D.; BONNING, B.C. Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. *Viruses*, v. 3, p. 1849–1869, 2011.
- MAIA, I.G.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J.Gen. Virol*, v. 77, p. 1335-1341, 1996.
- MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R. Doenças em plantas forrageiras. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, *ISSN 1983-974*, 2011.
- MENG, B.; GUBBA, A. Genetic Engineering: A novel and powerful tool to combat plant virus diseases [online]. *APSnet*. Disponível em: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/GeneticEngineering.aspx> [Acesso 21 dez 2014], 2000.
- LANGENBERG, W. G.; ZHANG, L. Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J Struct Biol*, v. 118, p. 243-247, 1997.
- LOPEZ-MOYA, J. J.; WANG, R. Y.; PIRONE, T. P. Context of the coat protein DAG motif affects *Potyvirus* transmissibility by aphids. *J. Gen. Virol*, v. 80, p. 3281-3288, 1999.
- MARIÑO, A. A.; GARRIDO, M. J.; ASCANIO, A. Reacción de cultivares de maíz al *Potyvirus* del mosaic del pasto Johnson. *Fitopatología Venezuela*, v. 35, 2009.

- MORALES, F. J.; OSPINA, M. D.; CASTANO, M.; CALVERT, L. A. Sequence analysis of the genomic RNA 3' terminal region of a *Potyvirus* from *Brachiaria* spp. related to guineagrass mosaic virus. *Journal of Phytopathology*, v. 144, n. 9-10, p. 485-489, 1996.
- OH, H. Y. Studies on the molecular biology and pathology of Johnsongrass mosaic virus. PhD dissertation, Department of Botany, La Trobe University, Bundoora, Melbourne, Austrália, 2003.
- PIRONE, T. P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol*, v. 34, p. 227-247, 1996.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. Computing Large Minimum-Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Molecular Biology and Evolution*, v. 26, p. 1641-1650, 2009.
- RYBICKI, E. P.; SHUKLA, D. D. Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. In: Barnett OW (Ed), Potyvirus taxonomy. *Arch Virol*, p. 139-170, Springer. New York, 1992.
- ROOSSINCK, M. J. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annu Rev Genet*, v. 46, p. 359-369, 2012.
- RIECHMANN, J. L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol*, v. 73, p. 1-16, 1992.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; AMMAR, E. D.; PIRONE, T. P.; SHOW, J. G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in *Potyvirus* infected cells, *J Gen Virol*, v. 74, p. 1945-1949, 1993.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 1989.
- SCHAAD, M. C.; HALDEMAN-CAHILL, R.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J. C. Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* 70, 7039-7048, 1996.
- SACHAAD, M. C.; JESEN, P. E.; CARRINGTON, J. C. Formation of plant RNA viral replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum targeted viral protein. *EMBO J*, v. 16, p. 4049-4059, 1997.
- SEIFERS, D. L.; HABER, S.; ENS, W.; SHE, Y. M.K.; STANDING, G.; SALOMON, R. Characterization of a distinct *Johnsongrass mosaic virus* strain isolated from sorghum in Nigeria. *Arch Virol*, v. 150, p. 557-576, 2005.

- SHUKLA, D. D.; WARD, C.W. Structure of *Potyvirus* coat proteins and its application in the taxonomy of the *Potyvirus* group. *Adv Virus Res*, v. 36, p. 273-314, 1989.
- SHULKA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. The Potyviridae. Wallingford, UK: CAB International, 1994.
- SHUKLA, D. D.; WARD, C.W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J Gen Virol*, v. 69, p. 2703-2710, 1988.
- SILVA, K. N.; NICOLINI, C.; SILVA, M. S.; FERNANDES, C. D; NAGATA, T.; RESENDE, R. O. First Report Of *Johnsongrass Mosaic Virus* (Jgmv) Infecting *Pennisetum purpureum* In Brazil. July, *Plant Disease*, v. 97, n. 7, p.1003, 2013.
- SURANTO, S.; GOUGH, K.H.; SHUKLA, D. D.; PALLAGHY, C. K. Coat protein sequence of Krish infecting strain of Johnsongrass mosaic *Potyvirus*. *Arch Virol*, v. 143, p. 1015-1020, 1998.
- TEAKLE, D. S.; GRYLLS, N. E. Four strains of sugarcane mosaic virus infecting cereals and other grasses in Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 24, p. 465-477, 1973.
- URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. *Potyvirus* protein: a wealth functions. *Virus Research*, v. 74, p.157-175, 2001.
- VERCHOT, J.; HERNDON, K. L.; CARRINGTON, J. C. Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology*, v. 190, p. 298-306, 1992.
- VERCHOT, J.; KOONIN, E. V.; CARRINGTON, J. C. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology*, v.185, n. 2, p. 527-535, 1991.
- WANG, X.; GUILLAM, S. Mutations in the GDD motif of rubella virus putative RNA-dependent RNA polymerase affect virus replication. *Virology*, v. 285, p. 322, 2001.
- WEI, T.; WANG, A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant *Potyvirus* replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J Virol*, v. 82, p. 12252-12264, 2008.
- WANG, R. Y.; AMMAR, E. D.; THORNBURY, D. W.; LOPEZ-MOYA, J. J.; PIRONE, T. P. Loss of potyvirus transmissibility and helper component activity correlates with non-retention of virions in aphid stylets. *Journal of General Virology*, v. 77, p. 861-867, 1996.

WEN, R. H; HAJUMORAD, M. R. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology*, v. 400, p. 1-7, 2010.

ANEXO

July 2013, Volume 97, Number 7 Page 1003

<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0013-PDN>

Disease Notes

First Report of *Johnsongrass mosaic virus*(JGMV) Infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil

K N. Silva and **C. Nicolini**, Dept. Biologia Celular, Universidade de Brasilia; **M. S. Silva**, Embrapa Cerrados; **C. D. Fernandes**, Embrapa Gado de Corte; and **T. Nagata** and **R. O. Resende**, Dept. Biologia Celular, Universidade de Brasilia

Open Access.

Tropical grass and legume species used as pasture grasses for cattle feeding cover over 25% of the agricultural area in Brazil. In recent years, plants showing virus-like symptoms have been observed in the main pasture grass growing areas. Plants of *Pennisetum purpureum* line CNPGL 00211 showing typical virus mosaic symptoms on leaves and growth reduction were collected in Bahia State, Brazil. Flexuous elongated potyvirus-like particles were observed in the leaf-dip preparation of diseased plants by electron microscopy. In addition, the virus was mechanically transmitted using a standard procedure for potyviruses (4) and produced similar symptoms in inoculated *P. purpureum* plants. For further molecular identification, total RNA was extracted from frozen symptomatic leaves following the guanidine thiocyanate method (3). cDNA synthesis was performed using oligonucleotide, OligodT₅₀-M10 and PCR was carried out using Potyvirus degenerate primers PY11 (5'-GGNAAYAAYAGYGGNCARCC-3') (2) and M10 (5'-AAGCAGTGTTATCAACGCAGA-3'). The amplified fragments of the expected size (approximately 2 kb comprising part of the N1b protein gene, the entire coat protein [CP] gene, and the 3' nontranslated region) were separated using agarose gel electrophoresis, excised, and cloned into plasmid vector pGEMT-Easy (Promega) according to the manufacturer's instructions. Four selected clones were sequenced (Macrogen, South Korea). The sequenced 2.0-kb fragment (GenBank Accession No. KC333416) was compared with sequences available in GenBank and the highest nucleotide identity of 79% was observed with *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) isolated in Australia (4). According to the *Potyvirus* species demarcation convention based on CP identity (1), the virus isolate from *P. purpureum* belongs to the JGMV species. However, the amino acid sequence of the N-terminus of the CP of the Bahia isolate is distinct from JGMV sequences reported in GenBank. The phylogenetic analysis of the CP confirmed the difference since this Bahia isolate was located in a clearly distinct branch separate from all JGMV isolates. To our knowledge, this is the first report of a JGMV in Brazil infecting tropical grass in the main pasture areas.

References: (1) M. J. Adams et al. Arch. Virol. 150: 459, 2005. (2) J. Chen et al. Arch. Virol. 146:757. 2001. (3) P. Chomczynski and N. Sacchi. Nature Protocols 1:581, 2006. (4) H. K. Laidlaw et al. Arch. Virol. 149:1633, 2004.

Cited by

Screening Sugarcane Wild Accessions for Resistance to Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)

M. F. Silva, M. C. Gonçalves, M. N. G. Melloni, D. Perecin, M. G. A. Landell, M. A. Xavier, and L. R. Pinto
Sugar Tech Jul 2014