



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Cucurbit whitefly-borne yellows virus, um recombinante de  
cucurbit aphid-borne yellows virus, estudos de transmissão e  
interação com o hospedeiro**

**THIAGO MARQUES COSTA**

**BRASÍLIA – DF  
2022**



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

# **Cucurbit whitefly-borne yellows virus, um recombinante de cucurbit aphid-borne yellows virus, estudos de transmissão e interação com o hospedeiro**

**THIAGO MARQUES COSTA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador: Tatsuya Nagata

**BRASÍLIA – DF**  
**2022**

Esta tese intitulada “**Cucurbit whitefly-borne yellows virus, um recombinante de cucurbit aphid-borne yellows virus, estudos de transmissão e interação com o hospedeiro**” foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular e avaliada pela banca examinadora abaixo assinada.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.

Tese avaliada em: 28/03/2022

### **Banca Examinadora**

Dr. Tatsuya Nagata (Presidente)  
Universidade de Brasília

Dr. Bergmann Morais Ribeiro  
Universidade de Brasília

Dr. Jorge Alberto Marques Rezende  
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros (ESALQ-USP)

Dr. Erich Yukio Tempel Nakasu  
Embrapa Hortaliças

Dr. Renato de Oliveira Resende (suplente)  
Universidade de Brasília

**BRASÍLIA – DF**  
**2022**

*A toda minha família  
e àqueles que, de certa forma, mesmo indiretamente, contribuíram,  
dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador Dr. Tatsuya Nagata por ter me oferecido o projeto, o espaço de trabalho e o tempo de ensinamentos que serão úteis não só à vida acadêmica. A sua paciência e conselhos foram muito importantes.

A toda família Marques e Costa, pelo apoio e incentivo, em especial a minha avó Selma e ao meu Pai Edson.

A todos os colegas de laboratório de Virologia da UnB.

À Ana Heloísa por todo o acolhimento e afeto ao longo desse processo. Da mesma forma agradeço aos meus amigos e parceiros Patrícia, Adriano, Felipe, Camila, Cris e Moana pelo apoio durante toda a jornada.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pelo seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram todo meu aprendizado acadêmico e ético, durante a realização da pós-graduação.

À Embrapa Hortaliças pela concessão do espaço para realização de parte dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO GERAL</b> .....	11
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	13
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	18
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	18
<b>CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura</b> .....	19
1.1. A cultura do meloeiro no Brasil .....	20
1.2. Principais viroses do meloeiro .....	21
1.3. Amarelão do meloeiro .....	23
1.4. Gênero <i>Polerovirus</i> .....	25
Características Gerais .....	25
Organização Genômica .....	26
1.5. Transmissão de polerovírus .....	29
1.6. Importância da biblioteca de cDNA do hospedeiro para o estudo do Complexo de Replicação Viral .....	30
1.7. Referências .....	31
<b>CAPÍTULO 2 - Avaliação da transmissão do isolado recombinante brasileiro de <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> por afídeo e mosca-branca e determinação do seu círculo de hospedeiro</b> .....	35
<b>RESUMO EXPANDIDO</b> .....	37
2.1. Abstract .....	39
2.2. Introduction .....	40
2.3. Materials and Methods .....	42
Maintenance of the CABYV-M1 isolate .....	42
Detection of CABYV-M1 by RT-PCR .....	42
Rearing of whiteflies ( <i>B. tabaci</i> MEAM1) .....	43
Whitefly transmission of CABYV-M1 .....	44
Virus uptake and retention in whitefly confirmed by RT-PCR .....	44
Transmission test of CABYV by aphid .....	45
Detection of CABYV by DAS-ELISA .....	45
Host range of CABYV-M1 .....	46
2.4. Results .....	46
Transmission of CABYV-M1 .....	46
Virus uptake and retention analysis in whiteflies and aphids by RT-PCR .....	47
Host range of CABYV-M1 .....	49
2.5. Discussion .....	51
2.6. References .....	55

<b>CAPÍTULO 3 – Construção de clone infeccioso do isolado recombinante brasileiro de <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> por Gibson Assembly</b> .....	57
RESUMO EXPANDIDO .....	59
3.1. Abstract .....	60
3.2. Introduction .....	60
3.3. Materials and Methods .....	61
Obtaining the CABYV-M3 genome in two fragments by RT-PCR for cloning by Gibson Assembly .....	61
Evaluation of the infectivity of the CABYV-M3 clone obtained by GA .....	62
3.4. Results and Discussion .....	63
3.5. References .....	66
<b>CAPÍTULO 4 – Construção de biblioteca de cDNA de meloeiro (<i>Cucumis melo</i>)</b> .....	67
4.1. Introdução .....	68
4.2. Material e Métodos .....	68
Preparo do material vegetal .....	68
Extração do RNA total e purificação do RNA mensageiro .....	69
Biblioteca de cDNA de meloeiro .....	69
Análise da Biblioteca de cDNA .....	70
4.3. Resultados .....	70
Obtenção do RNA total e do mRNA concentrado .....	70
Recombinação e caracterização da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDORNR22 e transformação em <i>E. coli</i> (DH10B) .....	71
Transferência da biblioteca de cDNA de meloeiro de pDORN22 para pDEST22 e transformação em <i>E. coli</i> (DH10B) .....	72
Análise da biblioteca de cDNA em pDEST22 por digestão e sequenciamento via Sanger .....	75
4.4. Discussão .....	77
Conclusões.....	79
4.5. Referências .....	80

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Meloeiros apresentando sintoma de amarelecimento das folhas mais velhas e medianas em lavoura de Mossoró (RN) ..... 24
- Figura 1.2.** Ilustração do esquema da partícula de vírus pertencentes ao gênero *Polerovirus* Simetria icosaédrica não envelopada de aproximadamente 23 nm de diâmetro. (foto retirada de ViralZone, <http://viralzone.expasy.org/610>) ..... 26
- Figura 1.3.** Representação esquemática do RNA genômico dos vírus do gênero *Polerovirus* de LATOURRETE *et al.*, 2021. O genoma de RNA contém VPg na extremidade 5', composto por nove ORFs que codificam as proteínas representadas pelas seguintes siglas: ORF0: proteína P0; ORF1: proteína P1 que contém Protease e VPg; ORF2: proteína 2 (RdRp); ORF3: capa proteica (CP); ORF5: CP-RTD; ORF4: proteína de movimento; ORF3a: proteína essencial de movimento em longa distância; ORF6 e ORF7 (funções desconhecidas) ..... 27
- Figure 2.1.** Melon plant leaves infected by CABYV-M1 with interveinal chlorosis symptom. (a) Leaf symptom of the original ..... 43
- Figure 2.2.** First transmission experiment of CABYV-M1 by whiteflies. (a) Agarose gel electrophoresis of reverse transcription (RT)-PCR samples amplified using CABYV-M1-specific primers (amplicon of 1,066 bp). Positive (lane 1) and negative (lane 2) controls of RT-PCR; plants inoculated with viruliferous (lanes 3–9) and aviruliferous (lanes 10–16) whiteflies. M: 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). (b) Young melon plant infected with CABYV-M1 at 15 days after inoculation by whiteflies showing interveinal chlorosis (left), and a healthy control plant (right) ..... 48
- Figure 2.3.** Absorbance value plot of double antibody sandwich (DAS)-ELISA (y axis) for the detection of CABYV-M1 in the VIR, AVR, and FREE treatments in three independent trials (x axis). VIR (circle): melon plants inoculated by viruliferous insects; AVR (star): melon plants inoculated by aviruliferous insects; and FREE (triangle): insect-free melon plants. The cut-off values (dotted line) were defined as three times the mean absorbance values of the healthy melon plant extracts. (a) Detection of CABYV-M1 in plants inoculated by whiteflies; (b) detection of CABYV-M1 in the plants inoculated by aphids ..... 48
- Figure 2.4.** Detection of CABYV-M1 by reverse transcription (RT)-PCR and agarose gel electrophoresis in insect and plant RNA samples used in the whitefly and aphid transmission experiments. (a) RT-PCR results of pooled samples (30 whiteflies) after acquisition access period (AAP) on healthy plants (AVR) (lanes 1, 2), and on infected plants (VIR) (lanes 3, 4); individual positive (amplicon of 1,066 bp) (lane 5) and negative (lane 6) plant controls. (b) RT-PCR results of pooled samples (30 whiteflies) after inoculation access period (IAP) of AVR (lanes 1, 2) and VIR (lanes 3, 4) insects; individual positive (lane 5) and negative (lane 6) plant controls. (c) RT-PCR results of pooled plant samples (12 and 13 samples) without whiteflies (FREE) (lanes 1, 2), inoculated with AVR (lanes 3, 4) and VIR (lanes 5, 6) whiteflies at 15 days post-



inoculation (dpi); individual positive (lane 7) and negative (lane 8) plant controls. (d) RT-PCR results of pooled samples (30 aphids) after AAP on healthy plants (lanes 1, 2), on infected plants (lanes 3, 4); individual positive (lane 5) and negative (lane 6) plant controls. (e) RT-PCR results of pooled samples (30 aphids) after IAP of AVR (lanes 1, 2), and VIR (lanes 3, 4); individual positive (lane 5) and negative (lane 6) plant controls. (f) RT-PCR results of pooled plant samples (12 and 13 samples) of treatments FREE (lanes 1, 2), AVR (lanes 3, 4), and VIR (lanes 5, 6) aphids at 15 dpi; individual positive (lane 7) and negative (lane 8) plant controls. M: 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) ..... 50

**Figure 3.1.** Genomic map of recombinant isolate of CABYV and the scheme of RT-PCR. Blue lines of the primers of 5' and 3' ends show overlap regions with plasmid vector pJL89 ..... 62

**Figure 3.2.** Symptoms in melon plants infiltrated CABYV-M3 clones with 15 dpi. A and B. Chlorosis caused by infections of CABYV-M3a and CABYV-M3b, respectively. The expected amplicon size is 1065 bps. C. Control plants without symptoms. D. Detections of CABYV by RT-PCR. M: size marker, 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific); wells 1 and 2: agroinfiltrated plants with empty vector; wells 3 and 4: agroinfiltrated plants with CABYV-M3a and CABYV-M3b, respectively, wells 5 and 6: negative and positive controls, respectively ..... 64

**Figura 4.1.** Biblioteca de cDNA de meloeiro em pDORN22 e pDEST22. A e B referentes ao tubo 1 e 2, respectivamente: diluições 1/100, 1/1000 e 1/10000 das células provenientes da transformação do cDNA em pDORN22. C e D referentes ao tubo 1 e 2, respectivamente: diluições 1/100, 1/1000 e 1/10000 das células provenientes da transformação do cDNA em pDEST22 ..... 74

**Figura 4.2.** Digestão com BsrGI de 10 amostras da biblioteca de cDNA em pDEST22. M: marcador; poços de 1 a 5: clones do tubo 1; poços de 6 a 10: clones do tubo 2 ..... 76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> Quantidade de melão produzido no Brasil por região (ton) .....	21
<b>Table 2.1.</b> Detection of CABYV-M1 after inoculation by whiteflies .....	51
<b>Table 3.1.</b> Detection of the CABYV-M1a by RT-PCR and Symptoms .....	65
<b>Tabela 4.1.</b> Quantificação do RNA total obtido de meloeiro .....	71
<b>Tabela 4.2.</b> Quantificação do mRNA total obtido de meloeiro .....	71
<b>Tabela 4.3.</b> Titulação da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDORN22 .....	72
<b>Tabela 4.4.</b> Titulação da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDEST22 .....	73
<b>Tabela 4.5.</b> Tamanho da banda e do inserto em Kb a partir da digestão por BsrGI de clones da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDEST22 .....	76
<b>Tabela 4.6.</b> Sequenciamento de clones da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDEST22 .....	77

## RESUMO GERAL

O Brasil é o nono maior produtor de melão no mundo, tendo a região Nordeste como a maior produtora, contribuindo com mais de 96% da produção nacional. Os estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia são os maiores produtores do fruto no país, produzindo mais de 515 mil toneladas. Das doenças que acometem a cultura do meloeiro no Brasil, as que se destacam são as viroses provocadas por potyvírus, comovírus, cucumovírus, tospovírus e carlavírus. O “Amarelão do meloeiro” é destacado como a principal doença dessa cultura, que é associada ao carlavírus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) e ao polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV). Essa doença é caracterizada por provocar em meloeiro forte clorose generalizada, reduzindo a área fotossintética da planta, o que ocasiona a redução no teor de açúcar (Brix) do fruto, prejudicando a sua comercialização, principalmente para o mercado exportador. Este estudo tem como objetivo identificar o vetor de transmissão e o círculo de hospedeiro de um isolado recombinante brasileiro de CABYV, denominado M1 (CABYV-M1) e construir uma biblioteca de cDNA de meloeiro. Para isso, foi avaliada a transmissibilidade do CABYV-M1 por mosca-branca (MEAM1) e por afídeo (*Aphis gossypii*). Constatou-se que o isolado CABYV-M1 é transmitido por mosca-branca (MEAM1), mas não por *Aphis gossypii*. Devido à sua transmissibilidade pela mosca-branca e à relação distante da proteína P3/P5 com o CABYV, o nome “cucurbit whitefly-borne yellows virus” é proposto para este CABYV recombinante brasileiro. Este se trata do primeiro relato de transmissão por mosca-branca do CABYV. Ainda, foi avaliado o círculo de hospedeiro do CABYV-M1 a partir da sua transmissão por mosca-branca. Observou-se que plantas da variedade TGR1551 de melão, abóbora e maxixe foram suscetíveis à infecção, enquanto plantas de feijão, alface, pepino, melancia e beterraba não foram suscetíveis ao CABYV-M1. Em relação a síntese do clone infeccioso de CABYV-M3, utilizando a metodologia de Gibson Assembly, foi possível obter dois clones infecciosos de CABYV-M3, denominados CABYV-M3a e CABYV-M3b. A infecciosidade dos clones foi confirmada por RT-PCR e sequenciamento. Plantas de meloeiro (cv. Goldex) agroinoculadas com os clones infecciosos CABYV-M3a e CABYV-M3b apresentaram sintomas típicos da doença ‘Amarelão’. Foi feito também o teste do clone infeccioso CABYV-M3a em um círculo de hospedeiro somente com cucurbitáceas e constatou-se que plantas de abóbora híbrida cv. Tetsukabuto, abóbora cv. Moranga Coroa, maxixe e melão amarelo híbrido cv. Goldex e cv. Calábria foram suscetíveis à infecção. Para a construção da biblioteca de cDNA de meloeiro foi utilizado o kit CloneMiner II cDNA Library Construction (Thermo Fisher Scientific). A biblioteca de cDNA de meloeiro obtida no vetor pDORN22 referente a amostra 1, foram contadas 678, 338 e 12 colônias e para a amostra 2, 724, 338 e 7 colônias nas diluições 1:100, 1:1000 e 1:10.000, respectivamente. A titulação final obtida para a biblioteca de cDNA foi de  $2,1 \times 10^7$  para a amostra 1 e  $5,7 \times 10^7$  para amostra 2, sendo consideradas eficientes. Após, a biblioteca obtida no vetor pDORN22 foi transferida para o vetor pDEST22. Em pDEST22, a biblioteca obtida nas titulações 1:100, 1:1000 e 1:10.000 foram de 797, 695 e 105, para a amostra 1, e 1258, 592 e 192, para amostra 2. A média das titulações nas mesmas diluições foram de  $6 \times 10^6$ , para a amostra 1, e  $8,8 \times 10^6$ , para a amostra 2. O resultando total da CFU para a amostra 1 e 2, respectivamente, foram de  $7,2 \times 10^7$  e  $10,5 \times 10^7$ , representando valores acima do considerado para uma biblioteca eficiente, que é no mínimo de um quociente a  $10^6$ . Por fim, para finalizar a confirmação da eficiência da biblioteca de cDNA de meloeiro, foram selecionados 10 clones em pDEST22 (vetor final) para

sequenciamento Sanger das amostras 1 e 2, sendo cinco de cada amostra. Todas as 10 amostras apresentaram sequências de *Cucumis melo* quando comparadas com sequências depositadas no GenBank, confirmando a eficiência da biblioteca. Como conclusão, a mosca-branca é o vetor natural de CABYV; os clones CABYV-M3a e CABYV-M3b são infecciosos; as variedades de melão, maxixe e abóbora são plantas suscetíveis ao CABYV; e a biblioteca de cDNA de meloeiro foi construída.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo*, “Amarelão do meloeiro”, *Polerovirus*, CABYV, mosca-branca, clone infeccioso, biblioteca de cDNA de meloeiro

## GENERAL ABSTRACT

Brazil is the ninth largest producer of melon in the world, with the Northeast region as the largest producer, contributing more than 96% of national production. The states of Rio Grande do Norte, Ceará and Bahia are the largest producers of the fruit in the country, producing more than 515 thousand tons. Of the diseases that affect the melon crop in Brazil, the ones that stand out are the viruses caused by potyviruses, comoviruses, cucumoviruses, tospoviruses and carlaviruses. However, “Amarelão do meloeiro” is highlighted as the main disease of this crop, which is associated with the carlavirus *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) and the polerovirus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV). This disease is characterized by causing strong generalized chlorosis in melons, reducing the photosynthetic area of the plant, which causes a reduction in the sugar content (Brix) of the fruit, impairing its commercialization, mainly for the export market. This study aims to identify the transmission vector and host circle of the recombinant isolate of CABYV from Brazil, called M1 (CABYV-M1) and to build a melon cDNA library. For this, the transmissibility of CABYV-M1 by whitefly (MEAM1) and by aphid (*Aphis gossypii*) was evaluated. It was found that the CABYV-M1 isolate is transmitted by whitefly (MEAM1), but not by *A. gossypii*. Due to its transmissibility by the whitefly and the distant relationship of the P3/P5 protein with CABYV, the name “cucurbit whitefly-borne yellows virus” is proposed for this recombinant CABYV from Brazil. This is the first report of CABYV whitefly transmission. In this same study, the host circle of CABYV-M1 was evaluated from its transmission by whitefly. It was observed that plants of the variety TGR1551 of melon, squash and gherkin were susceptible to infection, while plants of beans, lettuce, cucumber, watermelon and table beet were not susceptible to CABYV-M1. Regarding the synthesis of the infectious clone of CABYV-M3 using the Gibson Assembly methodology, it was possible to obtain two infectious clones of CABYV-M3, named CABYV-M3a and CABYV-M3b. The infectivity of the clones was confirmed by RT-PCR and sequencing. Melon plants (cv. Goldex) agroinoculated with the infectious clones CABYV-M3a and CABYV-M3b showed typical symptoms of the 'Amarelão' disease. The CABYV-M3a infectious clone was also tested in a host range with only cucurbits and it was found that hybrid squash cv. Tetsukabuto, cv. Moranga Coroa, gherkin and yellow melon cv. Calábria plants were susceptible to infection. For the construction of the melon cDNA library, the CloneMiner II cDNA Library Construction kit (Thermo Fisher Scientific) was used. The melon cDNA library obtained in the pDORN22 vector referring to sample 1 were counted 678, 338 and 12 colonies and for sample 2 724, 338 and 7 colonies at dilutions 1:100, 1:1000 and 1:10,000, respectively. The final titer obtained for the cDNA library was  $2.1 \times 10^7$  for sample 1 and  $5.7 \times 10^7$  for sample 2, being considered efficient. Afterwards, the library obtained in the pDORN22 vector was transferred to the pDEST22 vector. In pDEST22, the library obtained in the 1:100, 1:1000 and 1:10,000 titers were 797, 695 and 105, for sample 1, and 1258, 592 and 192, for sample 2. The average of the titrations at the same dilutions were  $6 \times 10^6$ , for sample 1, and  $8.8 \times 10^6$ , for sample 2. The total CFU result for sample 1 and 2, respectively, were  $7.2 \times 10^7$  and  $10.5 \times 10^7$ , representing values above the considered for an efficient library, which is at least a quotient of  $10^6$ . Finally, to finalize the confirmation of the efficiency of the melon cDNA library, 10 clones were selected in pDEST22 (final vector) for Sanger sequencing of samples 1 and 2, being five of each sample. All 10 samples showed *Cucumis melo* sequences when compared to sequences deposited in GenBank, confirming the efficiency of the library. In conclusion, the whitefly is

the natural vector of CABYV; clones CABYV-M3a and CABYV-M3b are infectious; the hybrid variety of yellow melon, gherkin and pumpkin are plants susceptible to CABYV; and the melon cDNA library was constructed.

**Keywords:** *Cucumis melo*, “Amarelão do meloeiro”, *Polerovirus*, CABYV, whitefly, infectious clone, melon cDNA library

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o nono maior produtor de melão no mundo, destacando-se como o principal produtor da América do Sul com aproximadamente 613 mil toneladas (FAOSTAST (2020)). A região Nordeste é a maior produtora, correspondendo a mais de 96% da produção, sendo os principais produtores os estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE) e Bahia (BA) correspondendo com cerca de 515.087 toneladas do fruto produzido por ano (IBGE, 2020). Grande parte do melão produzido no país é destinada à exportação, principalmente para a Europa (SECEX, 2020).

A cultura do meloeiro é acometida por diversas viroses no Nordeste brasileiro, dentre essas as de maior importância são causadas pelos seguintes vírus: família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*: *Papaya ringspot virus*, estirpe Watermelon (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV); da família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*: *Cucumber mosaic virus* (CMV); da família *Secoviridae*, gênero *Comovirus*: *Squash mosaic virus* (SqMV) (LIMA *et al.*, 2008; 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2000; RABELO FILHO *et al.*, 2013) e o vírus associado ao “Amarelão do meloeiro”, *Melon yellowing-associated virus* (MYaV), da família *Betaflexiviridae*, gênero *Carlavirus* (NAGATA *et al.*, 2003; NAGATA, 2005; COSTA *et al.*, 2017).

O ‘Amarelão do meloeiro’, também conhecido como ‘Amarelão’, é tido como a principal doença dessa cultura. A incidência dessa doença é alta e é uma das principais fontes de preocupação dos produtores de melão do RN, CE e BA, principais estados produtores desse fruto no Brasil. O manejo eficiente da doença ainda não foi estabelecido. Essa doença provoca redução no teor de açúcar (Brix) do fruto (COSTA, 2016), causando grande prejuízo à sua comercialização, principalmente para o mercado exportador.

Inicialmente, os sintomas dessa doença foram atribuídos à deficiência nutricional devido à dificuldade à época de determinação de um agente patológico do ‘Amarelão’ (LIMA *et al.*, 2008). Em 2003, NAGATA *et al.*, detectaram o novo carlavírus MYaV em plantas de melão coletadas no campo na região Nordeste apresentando sintomas de ‘Amarelão’. O MYaV possui genoma de RNA senso positivo de cerca de 9,1 Kb e é encapsidado em partícula com simetria helicoidal e flexuosa. Após, identificaram que o MYaV é transmitido por mosca-branca (NAGATA *et al.*, 2005), corroborando com o dado de alta infestação desse inseto nas áreas de

cultivo, em comparação com a população de afídeo, inseto transmissor da maioria das espécies do gênero *Carlavirus*. Portanto, o MYaV passou a ser considerado o principal agente etiológico do ‘Amarelão’. Em 2018 foi detectado a presença do *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) em amostras de meloeiro sintomáticos da região Nordeste brasileira (Costa *et al.*, 2019). O CABYV é classificado no gênero *Polerovirus* dentro da família *Solemoviridae*. A caracterização molecular do genoma do CABYV brasileiro revelou ser um vírus recombinante natural entre um típico CABYV e outro vírus desconhecido na região gênica da capa proteica (Costa *et al.*, 2019). O genoma viral do CABYV é caracterizado por RNA de fita simples senso positivo, com cerca de 5,7 kb encapsidado em partícula icosaédrica.

A maioria das espécies de polerovírus é classificada sendo transmitida por afídeo. No entanto, em 2019, GHOSH *et al.*, publicou a descoberta de transmissão por mosca-branca de um isolado da espécie tentativamente nomeado como *Pepper whitefly-borne vein yellows* (PWBYV), sendo o primeiro relato de transmissão por esse inseto de um membro do gênero *Polerovirus*. O CABYV é relatado como sendo transmitido por afídeo de maneira circulativa não propagativa em diversas regiões no mundo (YANG *et al.*, 2008) e não foi relatada a transmissão do CABYV por semente.

Embora os pulgões sejam conhecidos por serem o vetor do tipo comum de isolados de CABYV, quase nenhuma colônia de pulgões foi observada nas principais plantações de melão na região de Mossoró (RN), em que há alta incidência da doença do ‘Amarelão’. Em contrapartida, a incidência de mosca-branca nessas áreas de cultivo é alta. Com base nesta observação, e tendo em vista o primeiro relato do polerovírus PWBYV por mosca-branca, avaliou-se a hipótese da transmissão do CABYV recombinante por esse inseto. Portanto, a fim de avaliar a transmissibilidade do isolado brasileiro de CABYV, este trabalho se propôs a avaliar o vetor desse vírus por mosca-branca (MEAM1) e por afídeo (*Aphis gossypii*). Também este trabalho teve como objetivo construir um clone infeccioso desse vírus utilizando a metodologia de Gibson Assembly, tendo em vista que o uso de clones infecciosos viabiliza a realização de trabalhos sem a necessidade de estrutura de criação de insetos e permite a padronização do inóculo e do processo de inoculação, assegurando a homogeneidade do processo de infecção a cada inoculação.



A principal estratégia de controle de viroses é baseada no uso de plantas resistentes e, até o momento, não existem disponíveis variedades de meloeiro resistentes ao isolado brasileiro de CABYV. Portanto, a busca por fontes de resistência ou desenvolvimento de planta imune ao vírus é prioritária em programas de melhoramento de meloeiro. Entretanto, a caracterização do vírus também é essencial para se conhecer a doença e os fatores envolvidos com a sua incidência.

Para o desenvolvimento de plantas resistentes ou imune a patógenos, diversas tecnologias tem sido cada vez mais empregadas, como por exemplo a ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9 (ZAIDI *et al.*, 2016). No entanto, para o emprego dessa tecnologia, torna-se necessário entender a interação de vírus-hospedeiro, pois através desses estudos descobre-se quais proteínas dos hospedeiros (fator de hospedeiro) interagem com proteínas virais para o estabelecimento da infecção. Em geral, os vírus com genoma de RNA, sejam de plantas ou de animais, associam-se fortemente à superfície de organelas específicas do hospedeiro, gerando vesículas (ou compartimentos) destinadas a receber o complexo replicativo viral (CUI & WANG, 2016). Com este intuito de estudar a interação de vírus-hospedeiro, a construção de ferramentas moleculares como clone infeccioso do vírus e biblioteca de cDNA de planta de meloeiro em sistema de “yeast two-hybrid system ou Y2H” foram objetivos do estudo atual.

## **JUSTIFICATIVA**

O “Amarelão do meloeiro” é a principal doença da cultura do meloeiro e provoca redução no teor de açúcar do fruto, o que prejudica a sua comercialização. Este trabalho visa demonstrar que o CABYV é o principal vírus associado à doença do “Amarelão”. O CABYV em meloeiro isolado no Nordeste é recombinante e amplamente disseminado nas lavouras de meloeiro no Nordeste (cerca de 21.000 ha). Não há disponível cultivares resistentes ou imune ao CABYV brasileiro e atualmente o controle dessa virose baseia-se no manejo integrado. No entanto, a espécie do vetor não foi confirmada ainda. Este projeto tem como objetivo confirmar o vetor do isolado brasileiro do CABYV utilizando mosca-branca e afídeo. Considerando que o vírus não é mecanicamente transmissível, o clone infeccioso produzido viabilizará o procedimento de inoculação de modo uniforme e eficiente. O clone infeccioso será também útil para futuros estudos de função das proteínas virais e interação vírus-hospedeiro. O processo de

infecção dos polerovírus em nível molecular ainda é pouco conhecido, portanto, a construção de uma biblioteca de cDNA de meloeiro no sistema de “yeast two-hybrid system (Y2HS)” será o ponto de partida para futuros estudos da interação de proteínas virais com os fatores do hospedeiro.

### **OBJETIVO GERAL**

Este estudo tem como objetivo identificar o vetor de transmissão e o círculo do hospedeiro do isolado recombinante brasileiro de CABYV (CABYV-M1) e construir uma biblioteca de cDNA de meloeiro.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar se o CABYV-M1 é transmitido por mosca-branca (MEAM1);
- Avaliar se o CABYV-M1 é transmitido pelo afídeo *Aphis gossypii*;
- Determinar o círculo de hospedeiro do CABYV-M1;
- Produzir clone infeccioso de CABYV-M3;
- Construir biblioteca de cDNA de meloeiro no sistema de Y2H.

# CAPÍTULO 1

---

---

## Revisão de Literatura

## **CAPÍTULO 1 – Revisão de Literatura**

### **1.1. A cultura do meloeiro no Brasil**

No país, grande parte da produção de melão é destinada à exportação, correspondendo a cerca de 235 mil toneladas, de acordo com o último levantamento da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX, 2020). Os principais importadores do fruto são países da Europa, que adquirem cerca de 227 mil toneladas do melão brasileiro. A Holanda, Reino Unido e Espanha se destacam como os maiores compradores do fruto produzido no país, importando cerca de 40%, 29% e 24%, respectivamente (SECEX, 2020). Economicamente o fruto tem se destacado, gerando mais de 30,8 milhões de dólares em exportações, segundo o último levantamento feito na safra 2021/22 (CEPEA, 2022).

A região Nordeste é a maior produtora de melão do país, contendo uma área de aproximadamente 22.000 ha destinada para a produção do fruto. A produção do fruto no Nordeste corresponde a mais de 96% da produção nacional, com cerca de 594 mil toneladas (Tab. 1.1; IBGE, 2020). Os estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE) e Bahia (BA) são os principais produtores correspondendo a mais de 83% da produtividade nacional, com uma produção de 375.574, 73.838 e 65.675 toneladas, respectivamente (IBGE, 2020). RN, CE e BA destinam uma área de 13.669 ha, 2.860 ha e 2.673 ha, respectivamente, para a produção de melão. Além da importância econômica para o país, o cultivo do meloeiro tem grande valor social por ser fonte de emprego nas principais áreas produtoras da região Nordeste (LIMA *et al.*, 2008). A produtividade do meloeiro destaca-se pelo número de frutos que uma planta pode apresentar. Quando cultivadas de forma protegida, plantas dessa espécie produzem de um a três frutos por planta, devido ao abortamento natural das flores (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

**Tabela 1.1.** Quantidade de melão produzido no Brasil por região (ton).

<b>País</b>	<b>Produção (Ton)</b>
Brasil	613.933
Nordeste	594.577
Sul	16.538
Centro-Oeste	1.893
Norte	870
Sudeste	55

**Fonte:** IBGE - Produção Agrícola Municipal (2020)

No Nordeste, os tipos de melão gália, cantaloupe, amarelo (melão espanhol) e pele de sapo são os principais produzidos. A melancia (*Citrulus lanatus*) de cabeça pequena e sem semente, produzida em extensas áreas de cultivo, também se destaca como um fruto amplamente destinado à exportação na região Nordeste. Além destas, destacam-se outras cucurbitáceas cultivadas nessa região e, apesar de não serem exportadas, possuem também grande importância econômica, de subsistência e na produção de artefatos para a população e produtores locais, como: abóboras (*Cucurbita* spp.), pepino (*Cucumis sativus*), maxixe (*C. anguria*), cabaça (*Lagenaria siceraria*) e a bucha (*Luffa cylindrica*) (LANDAU *et al.*, 2020).

## **1.2.Principais viroses do meloeiro**

Vírus dos gêneros *Potyvirus*, *Crinivirus*, *Cucumovirus* e *Polerovirus* provocam as principais viroses de meloeiro nos principais países produtores do fruto (LUIS-ARTEAGA *et al.*, 1998; LECOQ, 2003; ZHAO *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2005; ÁVILLA & REIS, 2007; KESHAVARZ *et al.*, 2014; KNIERIM *et al.*, 2010; MANGLLI *et al.*, 2016). Espécies de *Polerovirus* são comumente relatadas em diversas regiões do mundo, como na Europa, Ásia, Oriente e na América do Norte (EUA). A ampla distribuição desses vírus se deve principalmente aos diversos eventos de recombinação em polerovírus, que também influencia na ampliação da sua gama de hospedeiro (YAKOUBI *et al.*, 2007; XIANG *et al.*, 2008; KINERIM *et al.*, 2010; KASSEM *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2015; CHEEWACHAIWIT *et al.*, 2017; IBABA *et al.*, 2017; VIDAL *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019).

No país são relatadas diversas espécies de vírus infectando cucurbitáceas, quem podem ocorrer em infecção simples ou mista. Em meloeiro, as principais viroses de destaques são o Mosaico do pepino, Mancha anelar do mamoeiro, Vírus do mosaico da melancia, Mosaico amarelo da abobrinha, Mosaico da abóbora, Clorose letal da abobrinha e o Amarelão do meloeiro. O Mosaico do pepino é causado pelo CMV, gênero *Cucumovirus*. Em meloeiro, essa doença provoca um severo raquitismo das plantas, mosaico foliar evidente, deformação e redução drástica do tamanho de folhas e dos internódios (ÁVILA e REIS, 2007). A Mancha anelar do mamoeiro é causado pelo potyvírus PRSV-W. Essa virose é tida como uma das mais severas em meloeiro tendo em vista que a infecção em estágio vegetativo impede o desenvolvimento da planta. Os sintomas dessa infecção são caracterizados por mosaico ou mosqueado de diferentes severidades. Ainda, observa-se nas folhas infectadas sintomas de mosaico severo, deformações foliares e enrugamento com aparência de bolhas (ÁVILLA & REIS, 2007). A doença Vírus do mosaico da melancia em meloeiro é provocada pelo potyvírus WMV e a sua infecção em meloeiro é caracterizada por apresentar sintomas de mosaico, rugosidade, faixa verde das nervuras, deformações e anéis necróticos (ÁVILA & REIS, 2007). O potyvírus ZYMV ocasiona a doença Mosaico amarelo da abobrinha. Essa doença provoca em meloeiro sintomas de severo mosaico, redução acentuada do limbo foliar (cordão de sapato), raquitismo, bolhosidade e necrose. Além disso, são observados nos frutos sintomas de deformação e, por fim, pode haver perdas totais na produção, caso a infecção ocorra no início do ciclo vegetativo da planta (ÁVILLA & REIS, 2007; SIMMONS *et al.*, 2013). Já o Mosaico da abóbora, virose causada pelo comovírus SqMV, provoca em meloeiro sintomas nas folhas mais novas de clareamento de nervura e manchas escuras no limbo foliar. Ainda, a depender das condições ambientais, as plantas infectadas podem desenvolver enação foliar e frutos malformados (OLIVEIRA *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2001). A Clorose letal da abobrinha, doença provocada pela infecção do tospovírus *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), em condições experimentais, provoca sintomas de mosqueado intenso com distorções foliares e necrose apical em meloeiro (ÁVILLA & REIS, 2007). No entanto, a infecção de ZLCV não foi detectada em condições naturais nessa cultura. Por fim, o Amarelão do meloeiro é tido como a principal virose da cultura do melão e essa doença é associada ao MYaV e, principalmente, a um isolado de polerovírus recombinante da CABYV (COSTA *et al.*, 2019). Os sintomas dessa

doença em meloeiro são caracterizados por forte clorose nas folhas mais velhas, principalmente após 30 dias da infecção (COSTA *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2015).

Tendo em vista que o Amarelão do meloeiro é responsável pela principal doença da cultura do melão no Brasil, abaixo o tema será desdobrado com mais detalhes.

### **1.3. Amarelão do meloeiro**

O Amarelão do meloeiro, também conhecido como ‘Amarelão’, é tido como a principal doença da cultura do meloeiro devido aos seus sintomas e à sua ampla ocorrência nos principais campos de cultivo do país. Inicialmente, suspeitou-se que essa virose era causada pelo crinivírus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), tendo em vista que o CYSDV é relatado em outros países, como nos Estados Unidos (LIVIERATOS *et al.*, 1999), provocando sintomas semelhantes em meloeiro. No entanto, até então não foram encontradas partículas de CYSDV em plantas de melão sintomáticas no país. Somente a partir de 2003 que a doença “Amarelão do meloeiro” foi associada ao MYaV (NAGATA *et al.*, 2003), espécie do gênero *Carlavirus*, transmitido por mosca-branca (NAGATA *et al.*, 2005). Portanto, por induzir sintomas de clorose generalizada nas folhas após a transmissão pelo inseto vetor e enxertia, o agente etiológico dessa doença ficou associado principalmente ao MYaV (NAGATA *et al.*, 2005).

Em 2019 foram detectados por *High throughput Sequencing* (HTS), em plantas de meloeiro sintomáticas coletadas no campo da região de Mossoró (RN) e Juazeiro (BA), isolados recombinantes do polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV), se tratando do primeiro relato de CABYV infectando meloeiro no Brasil (COSTA *et al.*, 2019). Em outros países, o CABYV é relatado infectando diversas cucurbitáceas e outras hospedeiras, como plantas de beterraba e alface (LECOQ *et al.*, 1992). Tendo em vista a sintomatologia apresentada por plantas infectadas por CABYV em outros países, o isolado recombinante de CABYV brasileiro passou a ser também associado ao ‘Amarelão’.

A caracterização da doença dá-se a partir da expressão dos sintomas após 30 dias do plantio, começando pelas folhas basais e alastrando-se por toda a planta. No estágio inicial da doença observa-se clorose acentuada nas folhas mais velhas e faixa verde das nervuras, mosaico (áreas de coloração verde-escuro e verde-claro) e manchas cloróticas nas folhas intermediárias. O processo de evolução da doença desencadeia o amarelecimento progressivo das folhas

medianas até abranger as folhas mais novas. Geralmente, as folhas do ponteiro das plantas permanecem sem sintomas. Segundo os produtores, a doença não provoca redução do tamanho e número dos frutos, porém observa-se uma considerável redução nos seus teores de açúcar, prejudicando-os comercialmente e interferindo na venda final do produto para os mercados internos e externos (LIMA *et al.*, 2015; 2011; 2008). COSTA (2016) realizou um experimento de campo cujo objetivo foi avaliar a qualidade de melões inodorus (casca amarela lisa) a partir de plantas sintomáticas para ‘Amarelão’, em que foi constatado que o teor de clorofila total das folhas está relacionado negativamente com a doença. A partir dessa observação, infere-se que a redução da clorofila nas plantas sintomáticas prejudica diretamente a produtividade e/ou a qualidade dos frutos. É possível observar na figura 1.1 os sintomas clássicos de amarelecimento de meloeiro provocados pela doença.



**Figura 1.1.** Meloeiros apresentando sintoma de amarelecimento das folhas mais velhas e medianas em lavoura de Mossoró (RN).

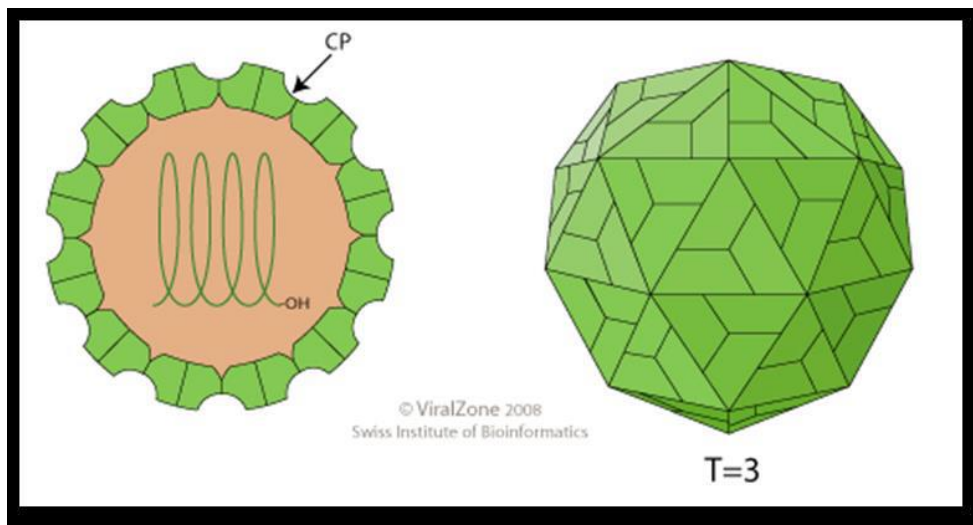


## 1.4. Gênero *Polerovirus*

### Características gerais

*Polerovirus* é um gênero classificado na família *Solemoviridae* junto aos gêneros *Enamovirus*, *Polemovirus* e *Sobemovirus*. Segundo o ICTV, o gênero *Polerovirus* agrupa 26 espécies virais e possui como espécie tipo o *Potato leafroll virus* (PLRV). Os polerovírus infectam uma grande variedade de plantas, de cereais a cucurbitáceas e pimentas e são transmitidos por uma ampla variedade de espécies de pulgões dos gêneros *Rhopalosiphum*, *Stiobion*, *Aphis* e *Myzus*. Em 2019, GHOSH *et al.*, fizeram o primeiro relato de transmissão de uma espécie de polerovírus por mosca-branca, o *Pepper vein yellows virus* (PeVYV), que foi tentativamente nomeado como *Pepper whitefly-borne vein yellows virus* (PeWBVYV), aumentando a diversidade de vetores desse gênero. Os polerovírus possuem genoma de RNA senso positivo e são encapsidados em partícula com simetria icosaédrica (T=3), não envelopada, com diâmetro de 25-30 nm constituído por cerca de 180 proteínas capsidiais. (Fig. 1.2; JAAG *et al.*, 2003).

Os critérios de demarcação de espécie dentro do gênero *Polerovirus* referem-se a (i) diferença de amplitude e especificidade na gama de hospedeiro; (ii) impossibilidade de proteção cruzada em interações unidirecionais e bidirecionais; (iii) especificidade sorológica (anticorpo monoclonal e policlonal); e (iv) diferença superior a 10% de identidade da sequência em aminoácido de qualquer gene (VEERAKONE *et al.*, 2015; D'ARCY *et al.*, 2000).

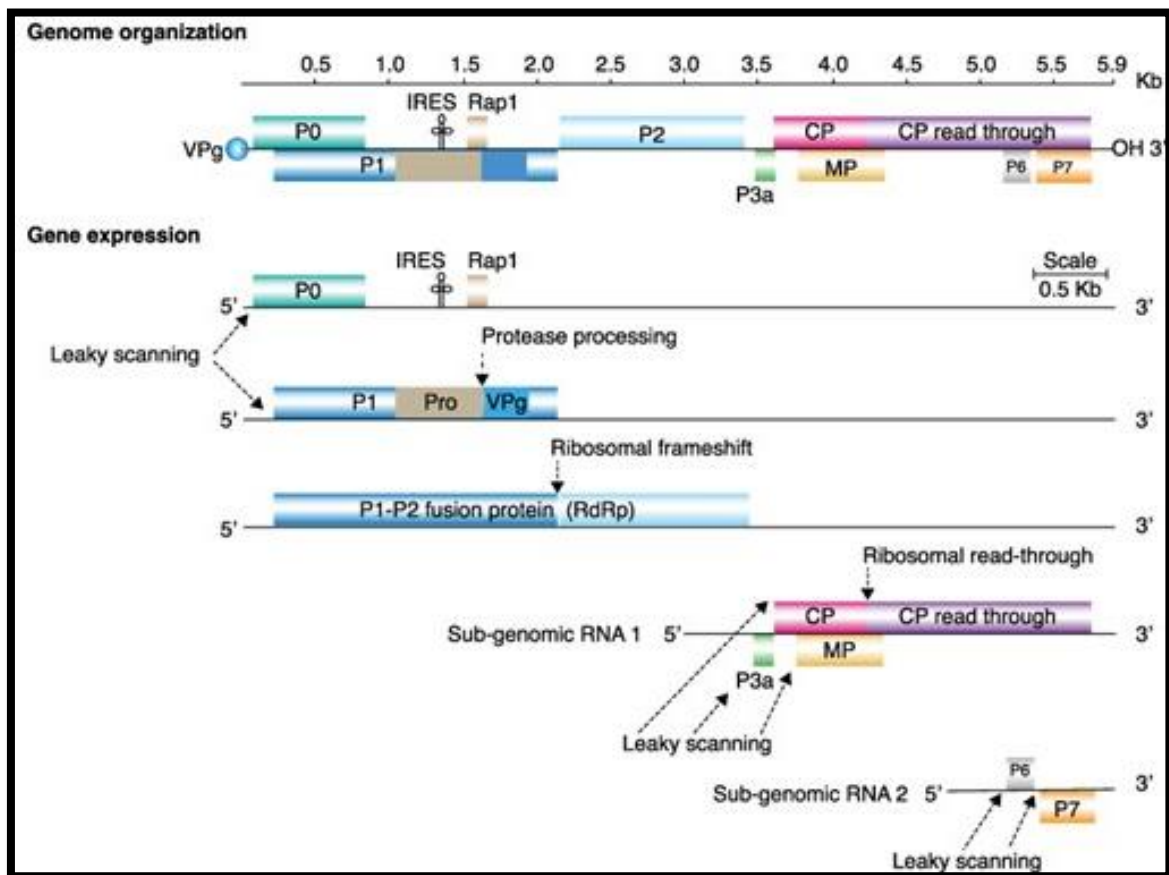


**Figura 1.2.** Ilustração do esquema da partícula de vírus pertencentes ao gênero *Pouterovirus* Simetria icosaédrica não envelopada de aproximadamente 23 nm de diâmetro. (foto retirada de ViralZone, <http://viralzone.expasy.org/610>).

### Organização genômica

Os vírus pertencentes ao gênero *Pouterovirus* possuem RNA de fita simples, monopartido, senso positivo, linear, sem cauda poli(A) na extremidade 3' e o seu tamanho varia de 5,3 a 5,9 Kb. O RNA desses vírus codifica nove *Open Reading Frames* (ORFs): ORF0 codifica a P0 que atua como supressora da maquinaria de silenciamento gênico da hospedeira; ORF1 codifica uma proteinase (Pro) e uma VPg, que atua como um *primer* durante a síntese de RNA viral pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). ORF2 tem duas formas de tradução: uma com *ribosomal leaky scanning* em outro frame que não seja igual do ORF1 em forma de sobreposição com ORF1. Outro é de *ribosomal frame shift* devido a sequência *Slippy hexamer* de GGGAAAC; ORF3a possui a iniciação de tradução não canônica (começa com AGC) e tem função essencial de movimentação viral a longa distância (Smirnova *et al.*, 2015); ORF3 e ORF5, por *ribosomal read-through*, codificam a CP-RTD (CP-Read Through Domain), com uma subunidade do capsídeo útil para a transmissão por afídeo (Jaag *et al.*, 2003; Knierim *et al.*, 2013); ORF4 encontra-se interna à ORF3 no quadro de leitura diferente e codifica a proteína de movimento (MP) célula a célula; ORF6 e ORF7 são traduzidos a partir de RNAs subgenômicos e suas funções não são conhecidas (**Fig. 1.3**). Como citado, o genoma desses vírus são encapsulados em partículas icosaédricas. Os genomas de pouterovírus são

particularmente diferentes das espécies de outros gêneros da família por possuírem características mais complexas e diferentes. Na família *Solemoviridae*, o genoma dos polerovírus é mais semelhante aos de enamovírus. Porém, o que principalmente os diferencia é a presença da VPg na extremidade 5' dos polerovírus. Além disso, os polerovírus codificam a sua MP (ORF4) internamente à ORF3, diferentemente dos *Enamovirus*, que não possuem a ORF4 (KNIERIM *et al.*, 2013)



**Figura 1.3.** Representação esquemática do RNA genômico dos vírus do gênero *Polerovirus* de LATOURRETTE *et al.*, 2021. O genoma de RNA contém VPg na extremidade 5', composto por nove ORFs que codificam as proteínas representadas pelas seguintes siglas: ORF0: proteína P0; ORF1: proteína P1 que contém Protease e VPg; ORF2: proteína 2 (RdRp); ORF3: capa proteica (CP); ORF5: CP-RTD; ORF4: proteína de movimento; ORF3a: proteína essencial de movimento em longa distância; ORF6 e ORF7 (funções desconhecidas).

A replicação dos polerovírus ocorre na região citoplasmática, porém não se tem dado a respeito de associação com alguma organela da hospedeira para a sua replicação. De modo geral, o vírus é inserido no interior celular por mediação do estilete do inseto transmissor e, em seguida, decorre-se o processo de decapsidação da partícula viral e o seu genoma é introduzido no citoplasma (KNIERIM et al., 2013).

Eventos de recombinação são muito relatados em espécies do gênero *Polerovirus* (MOONAN et al., 2000; PAGÁN & HOLMES, 2010). Esses eventos são descritos como processos de troca de material genético entre dois ou mais genomas. Diversos são os casos de recombinação em polerovírus, como, por exemplo, o a recombinação genômica entre o CABYV e *Melon aphid-borne yellows virus* (MABYV) observada na região intergênica (IR\*) entre a ORF2 e ORF3 (Knierim et al., 2010) (\* atualmente este termo “IR” não existe porque nesta região gênica, descobriu-se a presença de ORF3a, com códon de iniciação não-AUG). Também foi relatado um evento de recombinação na IR entre o *Suakwa aphid-borne yellows virus* (SABYV) com o MABYV (KNIERIM et al., 2013) e entre o *Pepo aphid-borne yellows virus com* (PABYV) com CABYV (IBABA et al., 2017). No Brasil, foi relatado um novo CABYV oriundo de evento de recombinação entre um isolado de CABYV da Europa e outro vírus desconhecido (COSTA et al., 2019).

Além disso, em polerovírus, há evidências de que eventos de recombinação entre as suas espécies tenham provocado mudanças na capacidade de infectar determinadas hospedeiras. Dombrovsky et al. (2013) relataram um novo polerovírus detectado em pimenta em Israel, denominado *Pepper yellow leaf curl virus* (PYLCV) que apresenta um evento de recombinação com os polerovírus de cucurbitáceas CABYV e *Tobacco vein-distorting virus* (TVDV). Esse caso demonstra o efeito, neste caso positivo ao vírus, desse mecanismo com a ampliação da gama de hospedeiros que o vírus é capaz de infectar. Além disso, há relatos em que recombinações nos genes das CPs de polerovírus têm provocado mudanças na especificidade do afídeo transmissor, podendo haver troca de espécie do inseto, como no caso do *Pepper vein yellows virus* (PeVYV; GHOSH et al., 2019; MURAKAMI et al., 2011).

## 1.5. Transmissão de polerovírus

Polerovírus são transmitidos para diversas plantas por espécies de pulgões de maneira circulativo e não-propagativo (BOISSINOT *et al.*, 2010; LECOQ *et al.*, 1992). O processo de transmissão do vírus por pulgões é baseado em duas etapas distintas: (i) aquisição do vírus e inoculação na planta. Como os pulgões passam longos períodos de tempo se alimentando da seiva do floema de uma planta infectada, as partículas virais são adquiridas durante o processo de ingestão da seiva e internalizados na camada de células epiteliais do intestino. Na hemocele, os vírions são transportados por mecanismos não caracterizados para as glândulas salivares acessórias, onde são novamente endocitados. Finalmente, (ii) a inoculação do vírus em uma nova planta ocorre quando as partículas virais são liberados no canal salivar e fluem junto com a saliva para uma nova planta hospedeira. Nesse processo não ocorre a multiplicação do vírus no corpo do inseto (BOISSINOT *et al.*, 2010; HECK & BRAULT, 2018).

Embora os vírus dentro de uma família taxonômica sejam conhecidos por utilizar diversos vetores para transmissão, muitos gêneros de vírus estão restritos a um tipo de vetor específico. Membros de *Solemoviridae* são um exemplo de que esses vírus são transmitidos exclusivamente por algumas espécies de pulgões (KING *et al.*, 2011). A especificidade vírus-vetor é um fator importante que limita o surgimento de novas associações vírus-vetor e, portanto, foi usado como um parâmetro importante para a classificação de vírus de plantas no passado. Porém, como citado, em polerovírus, o afídeo é o inseto vetor da maioria das espécies virais, até que em 2019, Ghosh *et al.*, demonstraram o primeiro caso de polerovírus sendo transmitido por mosca-branca, o PeWBVYV, e não por afídeo, contrariando o que até então vinha sendo observado no gênero *Polerovirus*.

O CABYV foi primeiramente relatado na França sendo transmitido por afídeo pelas espécies *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* (LECOQ *et al.* 1992). Entretanto, a ocorrência de pulgões em meloeiro nos principais campos de cultivo na região Nordeste, onde foi constatada alta incidência de CABYV, nunca foi observada. Devido à alta incidência do CABYV em áreas de cultivo de melão com alta proliferação de mosca-branca, levanta-se a hipótese de que esse inseto é vetor do CABYV recombinante (COSTA *et al.*, 2019).

## **1.6. Importância da biblioteca de cDNA do hospedeiro para estudo do Complexo de Replicação Viral**

Os vírus vegetais são patógenos intracelulares que realizam replicação e encapsidação do genoma dentro das células infectadas. Atualmente, desvendar as interações dos vírus com seus hospedeiros tem sido cada vez mais tema de pesquisa de vírus de plantas. A fim de se desvelar os recursos das células hospedeiras de forma eficiente para a replicação do seu genoma, os vírus vegetais precisam interagir com as células hospedeiras, manipular as vias das células hospedeiras e, finalmente, transformar as células hospedeiras em “fábricas virais”. A interação vírus-hospedeiro também pode desencadear respostas antivirais do hospedeiro. O objetivo emergente é que, não obstante a organização simples do genoma da maioria dos vírus de plantas, a interação dos vírus com seus hospedeiros é um processo bastante complexo e dinâmico, envolvendo inúmeras interações entre proteínas codificadas virais e do hospedeiro, proteínas da hospedeira e ácidos nucleicos virais e proteínas virais e membranas do hospedeiro (lipídios). Desvendar as interações entre os vírus e as células hospedeiras deve contribuir significativamente para a compreensão das infecções por vírus de plantas (BURCH-SMITH *et al.*, 2004; MOLHO *et al.*, 2021; NAGY, 2008; WANG *et al.*, 2017).

Em geral, determinados vírus de genoma constituído de RNA (seja de planta ou humano) associam-se fortemente à superfície de organelas específicas do hospedeiro, modificando-os de maneira a formar vesículas destinadas a receber o complexo replicativo viral. Acredita-se que a formação desses complexos (ou vesículas) em organelas entre proteínas de hospedeiro (fator do hospedeiro) e proteína de replicação viral (helicase e/ou polimerase) tem o objetivo de fugir dos processos de defesa do hospedeiro, como o mecanismo de RNA de interferência (HEINLEIN, 2015).

Proteínas de diversos vírus de planta já foram estudados por sistema de duplo híbrido de levedura (yeast two-hybrid system) com proteínas do hospedeiro (fatores de hospedeiro) obtidas a partir da construção de bibliotecas de cDNA de plantas com o objetivo de avaliar os fatores de hospedeiro de interação que influenciam na sua replicação. A exemplo, pode-se citar estudos envolvendo potyvírus, caulimovírus e tymovírus (LI *et al.*, 2017; NI *et al.*, 2017).

## 1.7.Referências

- ÁVILA, A., & REIS, A. 2007. Doenças do meloeiro (*Cucumis melo*) causadas por vírus. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica. INFOTECA-E.
- BURCH-SMITH, T. M.; ANDERSON, J. C., MARTIN, G. B.; DINESH-KUMAR, S. P. 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal*, 39(5), 734-746.
- BOISSINOT, S.; BENCHARKI, B.; MONSION, B.; REVOLLON, S.; ERDINGER, M.; REINBOLD, C.; BRAULT, V. 2010. What's new in polerovirus transmission?. In *Plant Viruses: Exploiting Agricultural and Natural Ecosystems*. 11. International Plant Virus Epidemiology Symposium and 3. Workshop of the Plant Virus Ecology Network (p. np).
- CEPEA. 2022. Centro de Estudos Avançados em Economia. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/br>>. Consultado em: 09 de fevereiro de 2022.
- CHEEWACHAIWIT, S.; WARIN, N.; PHUANGRAT, B.; RUKPRATANPORN, S.; GAJANANDANA, O.; BALATERO, C. H.; CHATCHAWANKANPHANICH, O. 2017. Incidence and molecular diversity of poleroviruses infecting cucurbit crops and weed plants in Thailand. *Archives of Virology* 1-8.
- CHITARRA, M. I. F. & CHITARRA, A. B. 2005. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras, UFLA 783p.
- CHOI, S.K., CHOI, G.S. 2015. First Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Cucumis melo* in Korea. *Plant Dis.* 100, 234.
- COSTA, T. M., BLAWID, R., ARANDA, M. A., FREITAS, D. M. S., ANDRADE, G. P., INOUE-NAGATA, A. K., & NAGATA, T. 2019. Cucurbit aphid-borne yellows virus from melon plants in Brazil is an interspecific recombinant. *Archives of virology*, 164(1), 249-254.
- COSTA, T. M., BLAWID, R., da COSTA JUNIOR, A. C., LIMA, M. F., de ARAGÃO, F. A., de ANDRADE, G. P., & NAGATA, T. (2017). Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil. *Archives of virology*, 162(12), 3899-3901.
- COSTA, J. D. A. (2016). Desempenho agrônômico e reação de genótipos quanto a viroses do meloeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Feira de Santana. Feira de Santana, Bahia.
- CUI, H., & WANG, A. (2016). Plum pox virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection. *Journal of virology*, 90(10), 5119-5131.
- D'ARCY, C. J.; DOMIER, L. L.; MAYO, M. A. 2000. Family luteoviridae. MHV van Regenmortel, CM Fauquest.
- FAOSTAT/FAO. 2020. Divisão de Estatística da FAO/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Consultado em 09 de fevereiro de 2022. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- GHOSH, S., KANAKALA, S., LEBEDEV, G., KONTSEDALOV, S., SILVERMAN, D., ALON, T., GHANIM, M. 2019. Transmission of a new polerovirus infecting pepper by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of virology*, 93(15), e00488-19.
- HEINLEIN, M. 2015. Plant virus replication and movement. *Virology*, 479, 657-671.

- HECK, M., & BRAULT, V. 2018. Targeted disruption of aphid transmission: a vision for the management of crop diseases caused by Luteoviridae members. *Current opinion in virology*, 33, 24-32.
- IBABA, J. D.; LAING, M. D.; GUBBA, A. 2017. Pepo aphid-borne yellows virus: a new species in the genus Polerovirus. *Virus genes* 53: 134-136.
- IBGE, Produção Agrícola Municipal 2020. Rio de Janeiro: IBGE, 2021.
- JAAG, H. M.; KAWCHUK, L.; ROHDE, W.; FISCHER, R.; EMANS, N.; PRÜFER, D. 2003. An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 8939-8944.
- KASSEM, M. A.; JUAREZ, M.; GÓMEZ, P.; MENGUAL, C. M.; SEMPERE, R. N.; PLAZA, M.; ARANDA, M. A. 2013. Genetic diversity and potential vectors and reservoirs of Cucurbit aphid-borne yellows virus in southeastern Spain. *Phytopathology* 103: 1188-1197.
- KING, A. M. Q.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. 2011. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Philadelphia, PA.
- KNIERIM, D.; DENG, T. C.; TSAI, W. S.; GREEN, S. K.; KENYON, L. 2010. Molecular identification of three distinct Polerovirus species and a recombinant Cucurbit aphid-borne yellows virus strain infecting cucurbit crops in Taiwan. *Plant pathology* 59: 991-1002.
- KNIERIM, D.; TSAI, W. S.; KENYON, L. 2013. Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described pepper vein yellows virus (genus Polerovirus) in six additional countries. *Archives of virology* 158: 1337-1341.
- KESHAVARZ, T.; SHAMS-BAKHS, M.; IZADPANAH, K.; MALBOOBI, M. A. 2014. Occurrence and genome analysis of Cucurbit chlorotic yellows virus in Iran. *Journal of Phytopathology* 162: 523-526.
- LANDAU, E. C., MARQUES, E. D. C., CAVALIERI, I. P. C., & DA SILVA, G. A. (2020). Evolução da produção de melão (Cucumis melo, Cucurbitaceae). Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE).
- LATOURRETTE, K.; HOLSTE, N. M.; GARCIA-RUIZ, H. 2021. Polerovirus genomic variation. **Virus Evolution**, v. 7, n. 2, p. veab102.
- LECOQ, H. 2003. Cucurbits. In *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries*. Springer Netherlands p. 665-688.
- LECOQ, H., BOURDIN, D., WIPF-SCHEIBEL, C. 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellow virus. *Plant Pathol.* 41, 749-761.
- LIMA, M.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A. K.; AVILA, A. 2008. O 'Amarelão' do melão: incidência e epidemiologia em áreas produtivas da região Nordeste. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E).
- LIMA, M. F. 2011. *Viroses de cucurbitáceas*. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E).
- LIMA, M. F.; OLIVEIRA, V. R.; AMARO, G. B. 2015. Cucurbit-infecting viruses in Brazil. In *V International Symposium on Cucurbits* 1151: 251-258.



- LIVIERATOS, I. C.; AVGELIS, A. D.; COUTTS R. H. A. Molecular characterization of the cucurbit yellow stunting disorder virus coat protein gene. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 89, p. 1050-1055, 1999.
- LUIS-ARTEAGA, M.; ALVAREZ, J. M.; ALONSO-PRADOS, J. L.; BERNAL, J. J.; GARCÍA-ARENAL, F.; LAVIÑA, A.; MORIONES, E. 1998. Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. *Plant Disease* 82: 979-982.
- LI, S., JIANG, X., LIANG, W., CHEN, S., ZHANG, X., ZUO, D., JIANG, T. 2017. Screening of the host factors of woodland strawberry interacting with P6 of strawberry vein banding virus by yeast two-hybrid system. *Scientia Agricultura Sinica*, 50(18), 3519-3528.
- MURAKAMI, R.; NAKASHIMA, N.; HINOMOTO, N.; KAWANO, S.; TOYOSATO, T.; 2011. The genome sequence of pepper vein yellows virus (family Luteoviridae, genus Polerovirus). *Archives of Virology* 156: 921-923.
- MANGLLI, A.; MURENU, M.; SITZIA, M.; TOMASSOLI, L. 2016. First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus infecting cucurbits in Italy. *New Disease Reports* 34:23-23.
- MOLHO, M.; CHUANG, C.; NAGY, P. D. 2021. Co-opting of nonATP-generating glycolytic enzymes for TBSV replication. *Virology*, 559, 15-29.
- MOURA, M. C. C. L.; LIMA, J. A. A.; OLIVEIRA, V. B.; GONÇALVES, M. F. B. 2001. Identificação sorológica de espécies de vírus que infetam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira* 26: 90-92.
- NAGATA, T.; KITAJIMA, E. W.; ALVES, D. M. T.; CARDOSO, J. E.; INOUE-NAGATA, A. K.; OLIVEIRA, M. R. V.; AVILA, A. C. 2003. Isolation of a novel carlavirus from melon in Brazil. *Plant Pathology*, Oxford, v.52, p.797.
- NAGATA, T.; ALVES, D. M. T.; INOUE-NAGATA, A. K.; TIAN, T. Y.; KITAJIMA, E. W.; CARDOSO, J. E.; AVILA, A. C. de. 2005. A novel flexivirus transmitted by whitefly. *Archives of Virology*, New York, v. 150, p. 379-387.
- NAGY, P. D. 2008. Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 217-242.
- NI, F., WU, L., WANG, Q., HONG, J., QI, Y., ZHOU, X. 2017. Turnip yellow mosaic virus P69 interacts with and suppresses glk transcription factors to cause pale-green symptoms in Arabidopsis. *Molecular plant*, 10(5), 764-766.
- OLIVEIRA, V.B.; LIMA, J. A. A.; VALE, C. C.; PAIVA, W. O. 2000. Caracterização biológica e sorológica de isolados de potyvirus obtidos de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. *Fitopatologia Brasileira* 25:628-636.
- RABELO FILHO, F. A. C. R.; NICOLINI, C.; RESENDE, R. O. et al. 2013. The complete genome sequence of a Brazilian isolate of yam mild mosaic virus. *Arch Virol* 158:515–518.
- SECEX. 2020. Secretaria do Comércio Exterior. Consultado em 09 de fevereiro de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/produtividade-e-comercio-externio/pt-br/assuntos/comercio-externio>.
- SIMMONS, H. E.; DUNHAM, J. P.; ZINN, K. E.; MUNKVOLD, G. P.; HOLMES, E. C.; STEPHENSON, A. G. 2013. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus research* 176: 259-264.

- VIDAL, A. H., SANCHES, M. M., ALVES-FREITAS, D. M. T., ABREU, E. F., LACORTE, C., PINHEIRO-LIMA, B., & RIBEIRO, S. G. 2018. First World Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus infecting Passionfruit. *Plant disease*, 102(12), 2665-2665.
- VEERAKONE, S., TANG, J. Z., WARD, L. I., LIEFTING, L. W., PEREZ-EGUSQUIZA, Z., LEBAS, B. S. M., & GUY, P. L. 2015. A review of the plant virus, viroid, liberibacter and phytoplasma records for New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 44(5): 463-514.
- WANG, R.; DU, Z.; BAI, Z.; LIANG, Z. 2017. The interaction between endogenous 30S ribosomal subunit protein S11 and Cucumber mosaic virus LS2b protein affects viral replication, infection and gene silencing suppressor activity. *Plos one*, 12(8), e0182459.
- XIANG, H. Y.; SHANG, Q. X.; HAN, C. G.; LI, D. W.; YU, J. L. 2008. First report on the occurrence of Cucurbit aphid-borne yellows virus on nine cucurbitaceous species in China. *Plant Pathology*, 57, 2: 390-390.
- YAKOUBI, S., DESBIEZ, C., FAKHFAKH, H., WIPF-SCHEIBEL, C., MARRAKCHI, M., & LECOQ, H. 2007. Occurrence of Cucurbit yellow stunting disorder virus and Cucumber vein yellowing virus in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 417-420.
- YANG, B. I.; YONGHONG, G. E.; CHUNLING, W. A. N. G.; XUEWEN, L. 2005. Melon production in China. In III International Symposium on Cucurbits 731: 493-500.
- YANG, X., THANNHAUSER, T. W., BURROWS, M., COX-FOSTER, D., GILDOW, F. E., & GRAY, S. M. (2008). Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (Luteoviridae). *Journal of virology*, 82(1), 291-299.
- ZAIDI, S. S. E. A., TASHKANDI, M., MANSOOR, S., & MAHFOUZ, M. M. (2016). Engineering plant immunity: using CRISPR/Cas9 to generate virus resistance. *Frontiers in plant science*, 7, 1673.
- ZHAO, M. F.; CHEN, J.; ZHENG, H. Y.; ADAMS, M. J.; CHEN, J. P. 2003. Molecular analysis of Zucchini yellow mosaic virus isolates from Hangzhou, China. *Journal of Phytopathology* 151: 307-311.

# CAPÍTULO 2

---

---

**Avaliação da transmissão do isolado recombinante brasileiro de *Cucurbit  
aphid-borne yellows virus* por afídeo e mosca-branca e determinação do seu  
círculo de hospedeiro**

## **CAPÍTULO 2 – Avaliação da transmissão do isolado recombinante brasileiro de *Cucurbit aphid-borne yellows virus* por afídeo e mosca-branca e determinação do seu círculo de hospedeiro**


Os resultados obtidos neste capítulo foram compilados em um artigo e publicados em abril de 2020 na revista *Plant Pathology* (FI: 2.3) com o título ‘**The recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil is a polerovirus transmitted by whiteflies**’ contendo como autores Thiago M. Costa, Alice K. Inoue-Nagata, Andreza H. Vidal<sup>1</sup>, Simone da G. Ribeiro e Tatsuya Nagata.

## RESUMO EXPANDIDO

O CABYV e outros polerovírus são relatados sendo transmitidos por afídeo de maneira circulativa não propagativa. Até o momento, não foi relatada a transmissão do CABYV por via mecânica ou por outro inseto (além do afídeo). De forma intrigante, na região Nordeste do Brasil onde foi detectado o CABYV verifica-se uma alta infestação de moscas-brancas, porém uma alta população de afídeos não é observada. Isso levantou uma hipótese do vetor desse vírus ser a mosca-branca. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a transmissibilidade do isolado brasileiro de CABYV-M1 por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e afídeo (*Aphis gossypii*) e avaliar o círculo de hospedeiros desse vírus. No teste de detecção do CABYV-M1 por DAS-ELISA utilizando a IgG conjugada produzida, foi observado que todas as plantas que receberam mosca-branca virulífera mostraram-se positivas à infecção pelo vírus. Entretanto, meloeiros inoculados com afídeos virulíferos não foram infectados pelo CABYV-M1. A transmissão do CABYV-M1 por mosca-branca foi confirmada por DAS-ELISA e RT-PCR com anticorpo e primers específicos, respectivamente, nas plantas inoculadas. Confirmou-se a presença do vírus no *pool* de afídeos que se alimentaram em plantas infectadas (afídeos do período de acesso a aquisição) e confirmou-se a ausência do vírus nos afídeos após o período de acesso a inoculação, demonstrando que os pulgões perderam ou diminuíram a carga viral após a alimentação em plantas saudáveis. Também não foi detectado o vírus em afídeos utilizados no tratamento AVR, tratamento em que plantas de meloeiro foram confinadas com afídeos avirulíferos (afídeos que se alimentaram em plantas saudáveis). Não foi detectado o vírus em *pools* de amostras de plantas coletadas aleatoriamente nos tratamentos VIR (plantas inoculadas com afídeos virulíferos), AVR (plantas inoculadas com afídeos avirulíferos) e S/AF (plantas sem afídeo), assegurando a eficácia do controle do experimento. Com relação ao círculo de hospedeiro, as propriedades biológicas do isolado brasileiro recombinante de CABYV-M1 são pouco conhecidas devido à falta de um procedimento de inoculação eficiente. Como a inoculação do vírus por mosca-branca foi bem sucedida neste estudo, foi utilizado esse inseto para a inoculação do CABYV-M1 nas plantas do círculo de hospedeiros. Das oito espécies de plantas testadas, o vírus foi detectado em apenas três: abóbora (híbrido de *C. maxima* × *C. moschata*, 11 positivos/20 inoculados), maxixe (*Cucumis anguria*, 19/20) e melão cv. TGR 1551 (*Cucumis melo*, 9/12) e cv. Goldex (9/10). O CABYV-M1 não foi detectado em pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*), em duas

cultivares de melancia (*Citrullus lanatus*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e beterraba de mesa (*Beta vulgaris*). Os sintomas observados nas plantas de abóbora e maxixe foram de forte clorose nas bordas das folhas inoculadas após 15 dias da inoculação (dpi). Após 30 dpi, os sintomas da clorose se espalharam-se pelo tecido foliar das folhas mais jovens. Nas plantas de melão inoculadas, os sintomas observados foram de clorose atenuada nas folhas inoculadas a 15 dpi e sintomas amarelados severos a 30 dpi, semelhantes aos sintomas frequentemente observados no campo.

# The recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil is a polerovirus transmitted by whiteflies

Thiago M. Costa<sup>1</sup> | Alice K. Inoue-Nagata<sup>2,3</sup>  Andreza H. Vidal<sup>1,4,5</sup> |  
Simone da G. Ribeiro<sup>4,5</sup> | Tatsuya Nagata<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup>PPG em Biologia Molecular,  
Department of Cell Biology,  
Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Embrapa Vegetables, Brasília, Brazil

<sup>3</sup>PPG em Fitopatologia, Universidade  
de Brasília, Brasília, Brazil

<sup>4</sup>Embrapa-Recursos Genéticos e  
Biotecnologia, Brasília, Brazil

<sup>5</sup>PPG em Ciências Naturais e Biotecnologia,  
Universidade Federal de Campina Grande,  
Cuité, Brazil

## Correspondence

Tatsuya Nagata, PPG em Biologia  
Molecular, Department of Cell Biology,  
Universidade de Brasília, Brasília, DF  
70910-900, Brazil.

## Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico, Grant/Award  
Number: 309670/2018-7

## 2.1. Abstract

The severe yellowing disease (*amarelo*) on melon plants is a serious problem in Brazil, although the causative agent remained unknown for a long time. Recently, recombinant isolates of cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) were reported as the possible causative agents of this disease on melon plants. Although aphids are known to be the vectors of the common type of CABYV isolates, almost no aphid colony was observed in the major melon fields in Brazil with high incidence of the severe yellowing disease. In contrast, whiteflies are often abundant. Based on this observation, the hypothesis of the transmission of recombinant CABYV by whiteflies was evaluated. After thorough transmission experiments, we found that this recombinant CABYV isolate was transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1, but not by *Aphis gossypii*. Furthermore, the host response by whitefly-based inoculation in cucurbits and other indicator plants showed differences in host range when compared to the common type of CABYV. Due to its transmissibility by the whitefly and the distant relationship of the P3/P5 protein to CABYV, the name “cucurbit whitefly-borne yellows virus” is proposed for this recombinant CABYV. This is the second report of polerovirus transmission by the whitefly *B. tabaci*, following the report of pepper whitefly-borne vein yellows virus.

## KEYWORDS

*Cucumis melo*, *Luteoviridae*, viruses of cucurbit

## 2.2. Introduction

*Cucurbit aphid-borne yellows virus* belongs to the genus *Polerovirus*, family *Luteoviridae*. Poleroviruses have linear, single-stranded, positive sense RNA genomes without a poly(A) tail at the 3' end, ranging in size from 5.3 to 5.9 kb. Polerovirus RNA genomes are encapsidated, forming icosahedral particles. In general, infection of poleroviruses, mainly in phloem cells, causes chlorosis and/or stunting symptoms (Domier, 2012). Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) was first reported in France (Lecoq *et al.*, 1992) and later in other countries in Europe, Africa, Asia, and America in melon, cucumber, squash, pumpkin, and watermelon plants (as cited in Costa *et al.*, 2019). This virus is often found in mixed infections with other viruses that infect cucurbit plants, especially potyviruses that share common aphid vectors (Mnari-Hattab *et al.*, 2005; Kassem *et al.*, 2007). Recently, we reported the genome of two atypical isolates of CABYV from melon plants collected in the northeast region of Brazil showing symptoms of *amarelão* (severe yellowing) by the high-throughput sequencing (HTS) and Sanger sequencing methods (Costa *et al.*, 2019). *Amarelão* is considered as the main viral disease of melon plants in Brazil. This disease is characterized by a severe symptom of leaf chlorosis, causing soluble solid content (degrees Brix) reduction in the fruits (Santos *et al.*, 2004). In 2003, a new whitefly-transmissible carlavirus, melon yellowing-associated virus (MYaV), was reported and thought to be the main pathogen of the severe yellowing disease on melon plants (Nagata *et al.*, 2003). However, frequent failures in the detection of MYaV in melon plants with yellowing symptoms suggested the presence of other viruses, and further studies using the HTS approach resulted in the discovery of CABYV (Costa *et al.*, 2019). Although the melon isolates M3 and JBM1 were identified as CABYV, they were clearly recombinant viruses (Costa *et al.*, 2019). The 5' genomic region (nucleotide [nt] 1–3,375) shared a high nt identity of 93.6% with the type isolate CABYV-N (accession number X76931) from France, whereas the following 2,302 nt, including the major and minor coat protein genomic regions, shared only 48.9% nt identity (Costa *et al.*, 2019). Thus, this recombinant virus has a totally different major coat protein (P3; 54.9% amino acid [aa] identity) and readthrough domain (P5 or minor coat protein; 21.9% aa identity) from those of the CABYV-N isolate, and the recombinant portion was derived from an unknown polerovirus (Costa *et al.*, 2019). This recombination might have caused distinct biological characteristics, especially in the vector transmissibility (Brault *et al.*, 2005).

Aphids acquire polerovirus particles from the phloem cells during feeding on infected plants. Then, the virions enter the aphid haemocoel through the hindgut (as for cereal yellow



dwarf virus; Gildow, 1993) and/or through the posterior midgut (as for potato leafroll virus, PLRV; Gildow *et al.*, 2000) by a receptor-mediated process (Gray and Gildow, 2003; Brault *et al.*, 2007). These viruses circulate in the haemocoel and enter the accessory salivary glands by a second receptor-mediated transport event (Gray and Gildow, 2003; Brault *et al.*, 2007). CABYV-N was reported to be transmitted by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* in a persistent and nonpropagative manner (Lecoq *et al.*, 1992; Brault *et al.*, 2005; Carmo-Sousa *et al.*, 2016). CABYV particles are taken up in the posterior midgut and hindgut of *A. gossypii* and *M. persicae* (Reinbold *et al.*, 2003).

Interaction with GroEL-like proteins produced by aphid endosymbionts and PLRV particles in the haemocoel is essential for the successful transmission by aphids (van den Heuvel *et al.*, 1994; Hogenhout *et al.*, 2000). Such interaction is thought to be very important for the protection of viral particles in the haemocoel in the insect vectors for nonpropagative and circulative viruses such as poleroviruses and begomoviruses (Morin *et al.*, 1999, 2000; Rana *et al.*, 2012).

The major melon production region of Brazil is located in the northeast, in an area of approximately 25,000 ha. In this region, insecticide application for controlling whiteflies (*Bemisia tabaci*) and leafminers (*Liriomyza* spp.) in melon fields is intensive, yet not efficient. Therefore, the melon seedlings in the field are covered by nonwoven fabrics until flowering to reduce the direct and indirect damage caused by the whiteflies and leafminers. Aphid infestations are rarely observed in melon fields in the region, although a high incidence of severe yellowing (*amarelão*) disease is observed on the melon plants. These field observations and the genome analysis of recombinant CABYV isolates prompted us to hypothesize that the recombinant CABYV is transmitted by whiteflies. During our study, Ghosh *et al.* (2019) demonstrated for the first time that a polerovirus (pepper whitefly-borne vein yellows virus, PeWBVYV) was transmitted by *B. tabaci* and not by aphids. Therefore, we performed transmission experiments using the whitefly *B. tabaci* (Middle East- Asia Minor 1, MEAM1) and the aphid *A. gossypii*. A host susceptibility study was also performed by whitefly transmission to test the host response of the recombinant CABYV compared to the common type of CABYV.

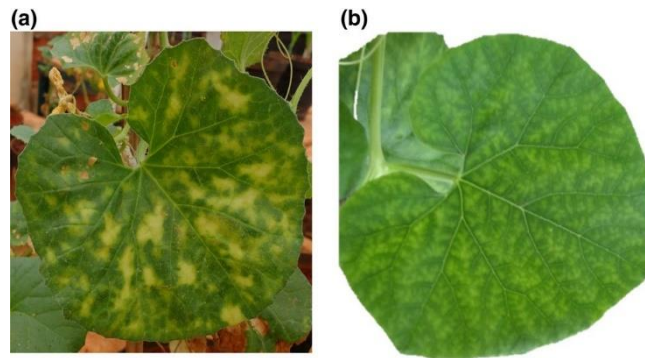
## 2.3. Materials and Methods

### Maintenance of the CABYV-M1 isolate

One melon sample showing symptoms of *amarelão* in a field with a high infestation of whiteflies was collected in Mossoró (Rio Grande do Norte State, Brazil) on 30 November 2016 and transplanted to a pot in greenhouse conditions (Fig. 2.1) and maintained by continuous planting of its cuttings. Virus detection was performed by reverse transcription (RT)-PCR, as described below to confirm the presence of the recombinant CABYV in the plant. The isolate was named CABYV-M1.

### Detection of CABYV-M1 by RT-PCR

The complete genome of the M1 isolate of CABYV was determined by Sanger sequencing of RT-PCR fragments along the genome, divided into four regions (for primer sequences, see Table S1): 5' and 3' regions and 5' and 3' ends. The cDNA recovery of 5' and 3' ends was performed by the rapid amplification of cDNA end (RACE) method, according to Costa *et al.* (2019). For specific detection of the recombinant-type CABYV, RT-PCR was performed with specific primers designed in this study, CABYV\_2663 For (5'-AACGCCCTCGGAATTGATCACC-3') and CABYV\_3728 Rev (5'-TTGCTGAATACAAATGCTTGCATC-3'), which anneal upstream and downstream, respectively, of the recombinant breaking point (nt 3,376). Amplicons of 1,066 bp were generated by using *Taq* DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). For the detection test, cDNA CABYV-M1 infected melon plant from the field and transplanted in the greenhouse. (b) Young melon plant leaf infected with CABYV-M1 recovered by planting the cuttings was synthesized with the random hexamer primer using total RNA of the melon sample prepared with the Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific). M-MLV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) was used for cDNA synthesis following the manufacturer's instructions. The PCR-amplified cDNA fragments with the expected size from three samples were directly sequenced for identification of the amplicons.



**FIGURE 2.1** - Melon plant leaves infected by CABYV-M1 with interveinal chlorosis symptom. (a) Leaf symptom of the original

The absence of other melon infecting viruses, such as MYaV and melon necrotic spot virus (MNSV), in the melon plant containing CABYV isolate M1 was confirmed by RT-PCR using specific primers (Table S1). Other viral pathogens were not detected by the HTS surveys in melon plants, including the one infected by the M1 isolate collected in 2016 and other cohorts of 2018, 2016, and 2014 in this region (authors' unpublished data). Furthermore, whitefly-transmitted viruses that infect cucurbitaceous plants and not reported in Brazil, such as begomoviruses, carlaviruses, criniviruses, ipomoviruses, and torradoviruses, were not detected in the HTS libraries (authors' unpublished results). Additionally, the absence of cucumber mosaic virus, groundnut ringspot virus, papaya ringspot virus, squash mosaic virus, watermelon mosaic virus, zucchini lethal chlorosis virus, and zucchini yellow mosaic virus, which are present in Brazil and infect cucurbit plants, was confirmed by antigen trapped ELISA (data not shown). Because the common-type CABYV was reported in passionfruit plants in Brazil (Vidal *et al.*, 2018), the absence of the common-type CABYV was confirmed in the plant infected with the M1 isolate by RT-PCR. The primer pair CABYV\_Common\_3103 For and CABYV\_Common\_3670 Rev (Table S1), for detection of the common-type CABYV, was designed based on CABYV-N (accession number X76931) and PF (Vidal *et al.*, 2018) isolates. CABYV isolate PF (MH257573) was used as the positive control for the detection of the common-type CABYV (Figure S1). All primers used here were newly designed in this study.

### **Rearing of whiteflies (*B. tabaci* MEAM1)**

The whiteflies used in the transmission experiments were from the rearing facility of the National Center for Research in Vegetables (Embrapa Vegetables, Brasilia, Brazil). Insects were propagated in a greenhouse on cabbage plants (*Brassica oleraceae* var. *capitata*). The *B. tabaci* population was identified as MEAM1 species based upon PCR and RFLP using *TaqI* as

recommended by Frohlich *et al.* (1999) and Bosco *et al.* (2006). For transmission use, the absence of CABYV in the whiteflies was confirmed by RT-PCR.

### **Whitefly transmission of CABYV-M1**

Initially, to verify the hypothesis that CABYV-M1 is transmitted by whiteflies, a pilot test was performed. In this preliminary trial, seven melon plants (cv. Goldex) were used for the transmission experiment. For the virus acquisition, approximately 250 aviruliferous whiteflies were transferred to 50 ml polyethylene tubes containing a CABYV-M1-infected melon leaf inserted in water agar medium. After 48 hr of acquisition access period (AAP), 30 whitefly individuals were transferred to a healthy 7-day-old melon plant (with one true leaf) in a plastic cup of 500 ml for a 48 hr inoculation access period (IAP). Then, the whiteflies were eliminated and the plants were maintained in an insect-free growth chamber at 25 °C with a 12 hr photoperiod. As the negative controls, seven uninoculated melon plants were kept in an insect-free compartment. Yellow traps were placed throughout the compartment to monitor the presence of insects, but neither aphids nor other insects were found. The inoculated plants were assessed at 15 days postinoculation (dpi) and the presence of CABYV-M1 was evaluated by RT-PCR using the same primers for the recombinant detection described above.

The second transmission experiment was done in a larger scale with three treatments: (a) melon plants with viruliferous whiteflies; (b) melon plants with aviruliferous whiteflies; and (c) melon plants without whiteflies. Each experiment consisted of 25 plants in three independent experiments, with a total of 225 melon plants for the whole experiment. The melon cultivar Goldex was used, and inoculation was performed in 7-day-old seedlings, presenting the first true leaf. The melon seedlings were kept in an insect-free growth chamber at 25 °C with a 12 hr photoperiod before and after inoculation. The plants were observed daily for symptom development and the presence of CABYV-M1 was assayed by double antibody sandwich (DAS)-ELISA using the newly produced polyclonal antibody in this study (see below).

### **Virus uptake and retention in whitefly confirmed by RT-PCR**

Whitefly cohorts used for transmission trials were tested by RT-PCR for the confirmation of virus uptake and retention before and after the inoculation period. After an AAP of 48 hr, those whiteflies without their stylets inserted in the leaf tissue were carefully collected from the virus source plants by suction, avoiding damage to the insect stylets. In

this cohort, one part of the whiteflies was used for transmission, and another part for evaluation for CABYV-M1 uptake by RT-PCR. Then, an IAP of 48 hr was performed using 30 whiteflies per melon plant. After the IAP, the whiteflies were carefully collected in tubes for RNA extraction and RT-PCR was performed to evaluate the retention of CABYV-M1 in the insect bodies. Aviruliferous whiteflies incubated with uninfected melon plants in the same conditions were used as controls for the transmission test and the virus uptake/retention evaluation by RT-PCR.

### **Transmission test of CABYV by aphid**

The aphid *A. gossypii* was used to evaluate its ability to transmit CABYV-M1 to melon plants. *A. gossypii* was isolated from the experimental field of Embrapa Vegetable station and was transferred to healthy melon plants. The absence of CABYV in the colonized *A. gossypii* was confirmed by RT-PCR using CABYV\_2663 For and CABYV\_3728 Rev primers (Table S1). The experiment was performed essentially as described above for whiteflies: (a) melon plants inoculated with aphids fed on a CABYV-infected leaf; (b) melon plants with aphids fed on a healthy leaf; and (c) melon plants without aphids. Three independent replicates of this experiment were performed. To evaluate CABYV uptake and retention in the aphid bodies, RT-PCR was performed as described above for whitefly samples.

### **Detection of CABYV by DAS-ELISA**

A polyclonal antiserum against the purified CABYV-M1 was produced. The virus particles were purified according to Takanami and Kubo (1979) using the infected melon plants (cv. Goldex) prepared by whitefly transmission in pilot tests and virus maintenance. The antibody was produced by immunizing a rabbit by subcutaneous injections into the rabbit back with the purified particles previously emulsified with Freund's complete adjuvant on the first injection and incomplete adjuvant from the second and third injections with 14-day intervals. For each injection, 0.17 mg purified viral particles was injected. The produced polyclonal antibody against CABYV-M1 was used for virus detection by DAS-ELISA, according to Clark and Adams (1977). For this purpose, the purified IgG was conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) and *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) was used as the detection substrate. The cut-off value for the positive reaction was defined as three times the mean absorbance values of the healthy melon plant extracts.

## Host range of CABYV-M1

In order to determine the susceptible hosts to CABYV-M1 infection, the following plant species were used for whitefly inoculation tests: cucumber (*Cucumis sativus* ‘Caipira 201’), lettuce (*Lactuca sativa* ‘Americana Delícia’), squash (*Cucurbita maxima* × *C. moschata* ‘Tetsukabuto’), two cultivars of watermelon (*Citrullus lanatus* ‘Crimson Sweet’ and ‘Charleston Gray Super’), common bean (*Phaseolus vulgaris*, rajado type), West Indian gherkin (*Cucumis anguria* ‘Isla 163’), and table beet (*Beta vulgaris* ‘Ewtt-SK’). The melon cv. TGR-1551, reported as resistant to CABYV infection (Kassem *et al.*, 2015), and cv. Goldex (susceptible control) were included in this test. Inoculations were performed with 10–20 plants using 30 viruliferous whiteflies per plant in two independent trials. CABYV-M1 detection was performed by RT-PCR.

## 2.4. Results

### Transmission of CABYV-M1

The genome sequence of the CABYV isolate M1 (accession number LC516688) shared 99.6% and 96.7% nt identity with the M3 and JMB1 recombinant CABYV isolates, respectively (Costa *et al.*, 2019). Therefore, the M1 isolate was also confirmed as the recombinant form of CABYV. Other viruses, including the common-type CABYV, were not detected by RT-PCR (Figure S1) or by ELISA, and thus the M1 isolate was used for all transmission tests. A pilot transmission experiment was carried out to evaluate whether the M1 isolate is transmitted by whiteflies from melon to melon plants. All seven plants inoculated by viruliferous whiteflies were positive for CABYV detection showing amplicons of the expected size of 1,066 bp (Figure 2a), indicating a transmission rate of 100% in melon plants. The virus was not detected in any of the control plants maintained without whiteflies (Fig. 2.2a). The symptoms in the inoculated plants were seen as pronounced interveinal chlorosis in the young leaves, but not in the healthy control plants (Fig. 2.2b). This experiment indicated that CABYV-M1 could be transmitted by whiteflies.

The second transmission test was performed with three treatments: (a) melon plants incubated with viruliferous whiteflies (VIR); (b) with aviruliferous whiteflies (AVR); and (c) plants free of whiteflies (FREE). Both AAP and IAP were 48 hr, and the test was performed in three independent experiments using 25 plants per treatment. Fifteen days after inoculation, the upper leaves were collected, and CABYV-M1 was detected by DAS-ELISA (Fig. 2.3a). All melon plants inoculated with viruliferous whiteflies (VIR treatment) were positive for the

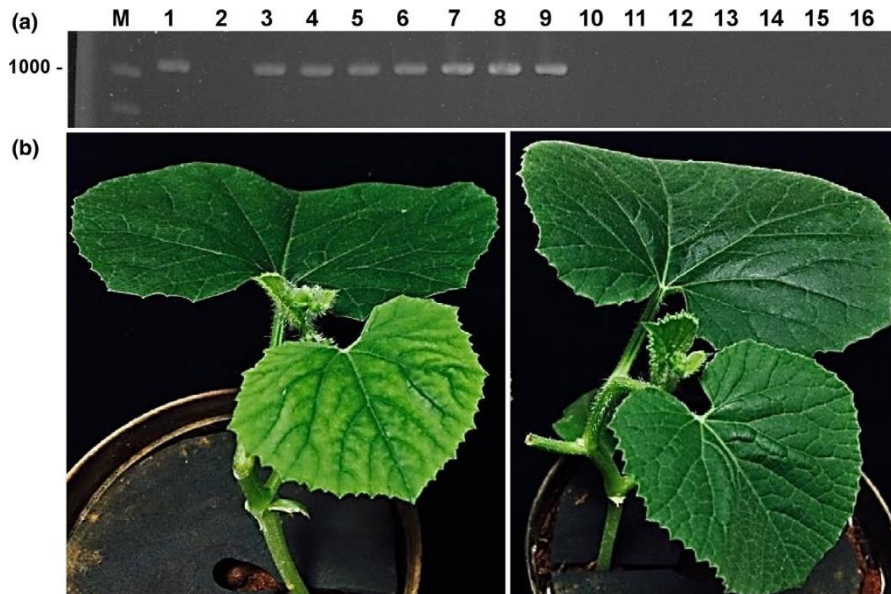


CABYV-M1 detection, as the absorbance values for these samples in the three replicates ranged from 0.22 to 1.87 (Fig 2.3a), which were above the cut-off values (0.175, 0.160, and 0.198, for the first to third trial, respectively). All the inoculated plants with viruliferous whiteflies (VIR) showed viral symptoms such as interveinal chlorosis in the leaves. The absorbance values of the plants with aviruliferous whiteflies (AVR) and the negative controls (FREE) were from 0.011 to 0.071 and 0.013 to 0.098, respectively, which were below the cut-off values. This result again demonstrated that the recombinant CABYV is transmitted by whiteflies.

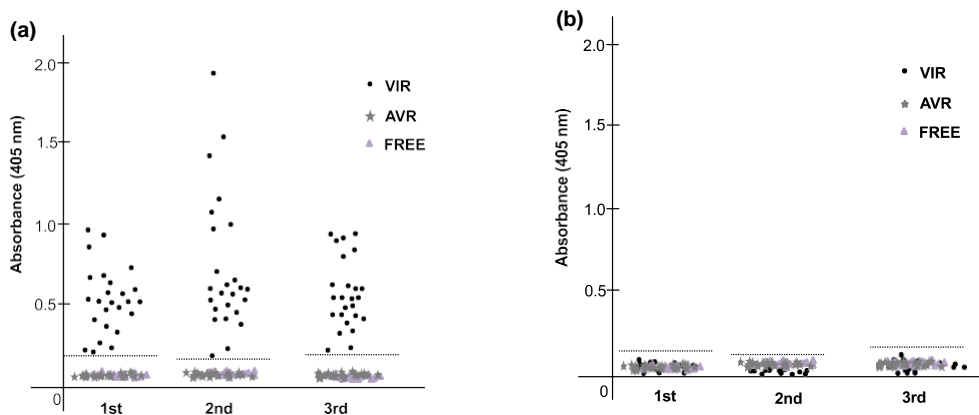
Because the common-type CABYV is transmitted by aphids, another transmission test was performed with a virus-free population of the aphid *A. gossipii*, which was maintained in healthy cucumber seedlings. The absence of the recombinant CABYV in the aphid population used in this assay was confirmed by RT-PCR. The transmission test with this aphid cohort was performed as described for whiteflies. Fifteen days after the inoculation procedure, no virus was detected by DAS-ELISA in the inoculated or in the noninoculated plants (Fig. 2.3b; Table S2).

### **Virus uptake and retention analysis in whiteflies and aphids by RT-PCR**

RT-PCR was performed to detect CABYV-M1 in the insect bodies during the course of the experiments. The virus uptake was clearly confirmed in whiteflies of the VIR treatment (two pools of 30 insects) immediately after the AAP (Figure 2a). The virus was also detected in the whiteflies after the IAP, showing virus retention in the insect bodies (Fig. 2.4b). RT-PCR was also performed using two pools of 30 aphids given an AAP of 48 hr, and virus uptake was confirmed (Fig. 2.4d). However, after an IAP of 48 hr, the virus was not detected in the two aphid pools (VIR treatment), showing that the virus retention in aphids was under the detection limit of RT-PCR (Fig. 2.4e). These results demonstrate that the recombinant CABYV-M1 isolate, in the tested conditions, was not transmitted to melon plants by aphids (Fig. 2.4f) but was transmitted by whiteflies (Fig. 2.4c).



**FIGURE 2.2** - First transmission experiment of CABYV-M1 by whiteflies. (a) Agarose gel electrophoresis of reverse transcription (RT)-PCR samples amplified using CABYV-M1-specific primers (amplicon of 1,066 bp). Positive (lane 1) and negative (lane 2) controls of RT-PCR; plants inoculated with viruliferous (lanes 3–9) and aviruliferous (lanes 10–16) whiteflies. M: 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). (b) Young melon plant infected with CABYV-M1 at 15 days after inoculation by whiteflies showing interveinal chlorosis (left), and a healthy control plant (right).

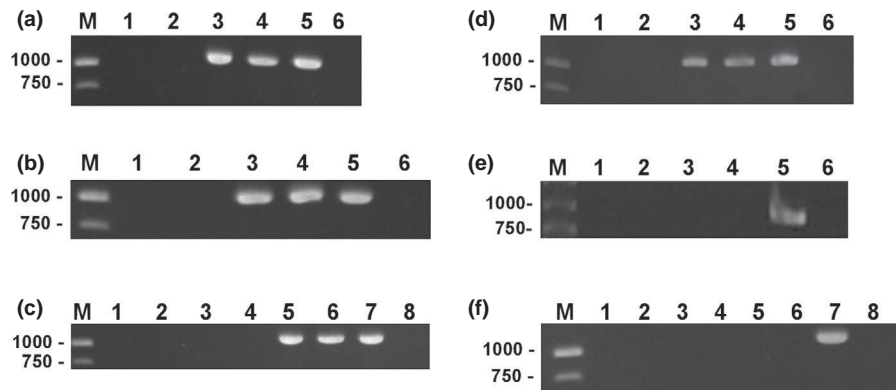


**FIGURE 2.3** - Absorbance value plot of double antibody sandwich (DAS)-ELISA (y axis) for the detection of CABYV-M1 in the VIR, AVR, and FREE treatments in three independent trials (x axis). VIR (circle): melon plants inoculated by viruliferous insects; AVR (star): melon plants inoculated by aviruliferous insects; and FREE (triangle): insect-free melon plants. The cut-off values (dotted line) were defined as three times the mean absorbance values of the healthy melon plant extracts. (a) Detection of CABYV-M1 in plants inoculated by whiteflies; (b) detection of CABYV-M1 in the plants inoculated by aphids.



### **Host range of CABYV-M1**

The biological properties of the recombinant CABYV isolate are poorly understood due to the lack of an efficient inoculation procedure. Because the virus inoculation using whiteflies was successful in this study, the susceptibility of test plant species to the recombinant Brazilian CABYV was evaluated. The inoculation was performed in two independent trials, and at 15 dpi the upper leaves were collected for CABYV-M1 detection by RT-PCR. Out of the eight tested plant species, the virus was detected in only three: squash (hybrid of *C. maxima* × *C. moschata*, 11 positive/20 inoculated), West Indian gherkin (*Cucumis anguria*, 19/20), and melon cv. TGR-1551 (*Cucumis melo*, 9/12) and cv. Goldex (9/10; Table 1). CABYV-M1 was not detected in cucumber (*Cucumis sativus*), lettuce (*Lactuca sativa*), in two cultivars of watermelon (*Citrullus lanatus*), bean (*Phaseolus vulgaris*) and table beet (*Beta vulgaris*). Symptoms observed in the plants of squash and West Indian gherkin were strong leaf edge chlorosis from 15 dpi on the inoculated leaf. At 30 dpi, the symptoms of chlorosis spread through the leaf tissue in the younger leaves. In the inoculated melon plants, the observed symptoms were attenuated chlorosis in the inoculated leaves at 15 dpi and severe yellowing symptoms at 30 dpi, similar to the symptoms frequently observed in the field (Costa *et al.*, 2019).



**FIGURE – 2.4** Detection of CABYV-M1 by reverse transcription (RT)-PCR and agarose gel electrophoresis in insect and plant RNA samples used in the whitefly and aphid transmission experiments. (a) RT-PCR results of pooled samples (30 whiteflies) after acquisition access period (AAP) on healthy plants (AVR) (lanes 1, 2), and on infected plants (VIR) (lanes 3, 4); individual positive (amplicon of 1,066 bp) (lane 5) and negative (lane 6) plant controls. (b) RT-PCR results of pooled samples (30 whiteflies) after inoculation access period (IAP) of AVR (lanes 1, 2) and VIR (lanes 3, 4) insects; individual positive (lane 5) and negative (lane 6) plant controls. (c) RT-PCR results of pooled plant samples (12 and 13 samples) without whiteflies (FREE) (lanes 1, 2), inoculated with AVR (lanes 3, 4) and VIR (lanes 5, 6) whiteflies at 15 days post-inoculation (dpi); individual positive (lane 7) and negative (lane 8) plant controls. (d) RT-PCR results of pooled samples (30 aphids) after AAP on healthy plants (lanes 1, 2), on infected plants (lanes 3, 4); individual positive (lane 5) and negative (lane 6) plant controls. (e) RT-PCR results of pooled samples (30 aphids) after IAP of AVR (lanes 1, 2), and VIR (lanes 3, 4); individual positive (lane 5) and negative (lane 6) plant controls. (f) RT-PCR results of pooled plant samples (12 and 13 samples) of treatments FREE (lanes 1, 2), AVR (lanes 3, 4), and VIR (lanes 5, 6) aphids at 15 dpi; individual positive (lane 7) and negative (lane 8) plant controls. M: 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

**Table 2.1. Detection of CABYV-M1 after inoculation by whiteflies**

Inoculated Plants	Common name/cultivar	Detection*
<b>Amarantaceae</b>		
<i>Beta vulgaris</i>	Beet, Ewtt-SK	0/12
<b>Asteraceae</b>		
<i>Lactuca sativa</i>	Lettuce, Americana Delícia	0/18
<b>Cucurbitaceae</b>		
<i>Cucumis anguria</i>	West Indian gherkin, Isla 163	19/20
<i>C. melo</i>	Melon, TGR1551	9/12
<i>C. melo</i>	Melon, Goldex	9/10
<i>C. sativus</i>	Cucumber, 201 Caipira	0/20
<i>Cucurbita maxima</i> x <i>C. moschata</i>	Squash, Tetsukabuto F1	11/20
<i>Citrullus lanatus</i>	Watermelon, Crimson Sweet	0/19
<i>C. lanatus</i>	Watermelon, Charleston Gray Super	0/16
<b>Fabaceae</b>		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Bean, rajado type	0/20

\*Number of positive plants in virus detection/number of total inoculated plants

## 2.5. Discussion

Melon is extensively cultivated for export in the north-east region of Brazil, particularly the county of Mossoró (Rio Grande do Norte state) and its surroundings. The incidence of *amarelão* disease is extremely high in almost all areas, and usually coincides with the high whitefly population in summer. We observed that the recombinant CABYV is more prevalent than MYaV in these fields (authors' unpublished data). However, not a single aphid was observed during our visits in December (peak of melon production) in this region during three consecutive years with c.100% of melon plants showing severe yellowing symptoms. Based on this observation and the high infestation of whiteflies in melon plants with *amarelão* symptoms, we hypothesized that the recombinant isolate of CABYV from Brazil is transmitted by whiteflies. This hypothesis was confirmed through the transmission assay in this study. This is the second report of a polerovirus being transmitted by whiteflies (*B. tabaci* MEAM1). Previously, only PeWBVYV was described as having whiteflies as vectors (Ghosh *et al.*, 2019). Interestingly, PeWBVYV was also

reported as a recombinant virus between pepper vein yellows virus-2 (PeVYV-2) and African eggplant yellows virus (AeYV). The vector of PeVYV-2 is an aphid and the one of AeYV is also thought to be an aphid. Thus, the mechanism of how PeWBVYV is transmitted by whitefly is not well elucidated yet (Ghosh *et al.*, 2019). As in the case of PeWBVYV, the recombinant CABYV was not transmitted by aphids in this study. Although both poleroviruses are transmitted by a whitefly, the amino acid sequence of the P3 and P5 proteins had no close relationship between recombinant CABYV-M1 and PeWBVYV, sharing 49.8% and 17.4% identities, respectively. Any common features in the mechanism of transmission by whiteflies between these two poleroviruses could be inferred by the sequence identity analysis.

The genomic region of P3/P5 of the recombinant CABYV is thought to be generated by recombination between the common-type CABYV and an unknown polerovirus (Costa *et al.*, 2019). It is likely that this recombination happened after the common-type CABYV was introduced to Brazil. The recently discovered CABYV isolate from passionfruit plants in Brazil (Vidal *et al.*, 2018) was found to be of the common-type of CABYV, sharing 87%–94% nt sequence identity of the whole genome with other common-type isolates. The sequence of this passionfruit isolate had a high identity in the P1–P2 genomic regions (nonrecombinant region) with the recombinant melon isolates of CABYV. Because the passionfruit isolate and the recombinant isolates of CABYV probably have the same evolutionary origin after entering Brazil, the recombination event occurred in Brazil and the parental virus of this recombinant is another whitefly-transmissible polerovirus existing in Brazil. As the result of the recombination, CABYV gained a great advantage for its dissemination, because whitefly is one of the most successful plant virus vectors and pests of the current agricultural landscape in Brazil. The frequent use of HTS for the virome study in plant virology increases the chance to find this original whitefly transmissible isolate in the future. It is also important to map the distribution of the recombinant-type and the nonrecombinant type of CABYV in the country.

Until now, there has been no evidence of polerovirus/luteovirus replication in the aphid vector. The chaperonin camouflage of virus particles in the insect haemocoel by the association of GroEL of *Buchnera* endosymbiont bacteria is known to be essential for virus transmission by aphids (van den Heuvel *et al.*, 1994; Hogenhout *et al.*, 2000; Gray and Gildow, 2003). Interestingly, whiteflies also possess GroEL homologs in their bodies, that

are produced by *Hamiltonella defensa* endosymbionts (Morin *et al.*, 1999; Gottlieb *et al.*, 2010). This GroEL homolog protects tomato yellow leaf curl virus (TYLCV; genus *Begomovirus*) particles in the haemocoel during the circulation in the whitefly body before being transmitted. The interaction of GroEL homologs produced by other endosymbiont bacteria, such as *Portiera*, *Rickettsia*, *Arsenophonus*, and *Wolbachia*, was not observed with the TYLCV coat protein (Gottlieb *et al.*, 2010). However, one or more GroEL homolog proteins may interact with the recombinant CABYV virions, as observed for PLRV (van den Heuvel *et al.*, 1994), protecting them against degradation in the haemocoel. Thus, it is expected that the successful transmission of the recombinant CABYV by whitefly occurs by a similar mechanism.

The transmission vector type is one of the key parameters for the genus demarcation criteria in plant virus taxonomy, and usually, members in the same genus share the same vector type (for example, only by aphids or only by whiteflies). However, there are exceptions as seen in the genus *Carlavirus*. The viruses classified in the genus *Carlavirus* are generally transmitted by aphids. The two exceptions in this genus are cowpea mild mottle virus (CPMMV) and MYaV, which are transmitted by whitefly (Muniyappa and Reddy, 1983; Nagata *et al.*, 2005). Besides sharing the same vector, CPMMV and MYaV have a distinct evolutionary lineage within the carlaviruses (Nagata *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2019). This study presents another example of a genus containing members that are transmitted by two different types of vectors, aphid for most members of *Polerovirus* and whitefly for PeWBVYV and the recombinant CABYV. We believe that some common features in the transmission mechanism observed in both aphids and whiteflies, such as the interaction of virus particles with GroEL homologs in the haemocoel and the feeding behaviour in the phloem, might have contributed to the shift of the vector type. By studying the host range, it was found that the recombinant CABYV was not able to infect plants of *C. lanatus*, *C. sativus*, and *L. sativa*, which were reported as natural or experimental hosts of the common-type CABYV (Lecoq *et al.*, 1992; Mnari-Hattab *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2015; Carmo Sousa *et al.*, 2016). Obviously, these differences are not conclusive because the host response may differ among cultivars in the same plant species. However, this result corroborates the field observation that watermelon plants in the northeast region of Brazil do not show symptoms or are not infected with the recombinant CABYV isolates, even when cultivated next to melon fields with a high incidence of severe yellowing disease (data not shown). Besides, it seems that the recombinant CABYV overcame the resistance of *C.*

*melo* cv. TGR-1551, which is resistant to the common-type CABYV (Kassem *et al.*, 2015).

In conclusion, the recombinant CABYV-M1 isolate was transmitted by the whitefly *B. tabaci* MEAM1, but not by the aphid *A. gossipii*. Because the term “aphid-borne” is not adequate, and because the P3 and P5 genes of the recombinant isolates of CABYV share less than 90% amino acid identity with those of original CABYV isolates, we propose the classification of this virus into a new species suggested as Cucurbit whitefly-borne yellows virus (CWBYV).

## 2.6. References

- Bosco, D., Loria, A. and Sartor, C. (2006) PCR-RFLP identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. *Phytoparasitica*, 34, 243–521.
- Brault, V., Peigon, P., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E. *et al.* (2005) The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *Journal of Virology*, 79, 9685–9693.
- Brault, V., Herrbach, É. and Reinbold, C. (2007) Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron*, 38, 302–312.
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A. and Plaza, M. (2016) Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. *Annals of Applied Biology*, 169, 284–297.
- Choi, S.-K., Yoon, J.-Y. and Choi, G.-S. (2015) Biological and molecular characterization of a Korean isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus infecting *Cucumis* species in Korea. *Plant Pathology Journal*, 31, 371–378.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475–483.
- Costa, T.M., Blawid, R., Aranda, M.A., Freitas, D.M.S., Andrade, G.P., Inoue-Nagata, A.K. *et al.* (2019) Cucurbit aphid-borne yellows virus from melon plants in Brazil is an interspecific recombinant. *Archives of Virology*, 164, 249–254.
- Domier, L.L. (2012) Luteoviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. (Eds.) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses – Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York, NY: Academic Press, pp. 1045–1053.
- Frohlich, D.R., Torres-Jerez, I.D. and Bedford, D. (1999) A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 8, 1683–1691.
- Ghosh, S., Kanakala, S., Lebedev, G., Kontsedalov, S., Silverman, D., Alon, T. *et al.* (2019) Transmission of a new polerovirus infecting pepper by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Virology*, 93, e00488–19.
- Gildow, F.E. (1993) Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology*, 83, 270–277.
- Gildow, F.E., Reavy, B., Mayo, M.A., Duncan, G.H., Woodford, J.A., Lamb, J.W. *et al.* (2000) Aphid acquisition and cellular transport of potato leafroll virus-like particles lacking P5 readthrough protein. *Phytopathology*, 90, 1153–1161.
- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Kontsedalov, S., Skaljac, M., Brumin, M. *et al.* (2010) The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *Journal of Virology*, 84, 9310–9317.
- Gray, S. and Gildow, F.E. (2003) Luteovirus–aphid interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 539–566.
- Van den Heuvel, J.F.J.M., Verbeek, M. and van der Wilk, F. (1994) Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Journal of General Virology*, 75, 2559–2565.
- Hogenhout, S.A., van der Wilk, F. and Verbeek, M. (2000) Identifying the determinants in the equatorial domain of *Buchnera* GroEL implicated in binding potato leafroll virus. *Journal of Virology*, 74, 4541–4548.



- Kassem, M.A., Sempere, R.N. and Juárez, M. (2007) Cucurbit aphid-borne yellows virus is prevalent in field-grown cucurbit crops of southeastern Spain. *Plant Disease*, 91, 232–239.
- Kassem, M.A., Gosalvez, B. and Garzo, E. (2015) Resistance to cucurbit aphid-borne yellows virus in melon accession TGR-1551. *Phytopathology*, 105, 1389–1396.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O. *et al.* (1992) A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology*, 41, 749–761.
- Mnari-Hattab, M., Kummert, J. and Roussel, S. (2005) First report of cucurbit aphid-borne yellows virus in Tunisia causing yellows on five cucurbitaceous species. *Plant Disease*, 89, 776.
- Morin, S., Ghanim, M. and Zeidan, M. (1999) A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 256, 75–84.
- Morin, S., Ghanim, M. and Sobol, I. (2000) The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology*, 276, 404–416.
- Muniyappa, V. and Reddy, D.V.R. (1983) Transmission of cowpea mild mottle virus by *Bemisia tabaci* in a nonpersistent manner. *Plant Disease*, 67, 391–393.
- Nagata, T., Kitajima, E.W., Alves, D.M.T., Cardoso, J.E., Inoue-Nagata, A.K., De Oliveira, M.R.V. *et al.* (2003) Isolation of a novel carlavirus from melon in Brazil. *Plant Pathology*, 52, 797.
- Nagata, T., Alves-Freitas, D. and Inoue-Nagata, A.K. (2005) A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. *Archives of Virology*, 150, 379–387.
- Rana, V.S., Singh, S.T. and Priya, N.G. (2012) Arsenophonus GroEL Interacts with CLCuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly *B. tabaci*. *PLoS ONE*, 7, e42168.
- Reinbold, C., Herrbach, É. and Brault, V. (2003) Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Journal of General Virology*, 84, 3473–3484.
- Santos, A.A., Bezerra, M.A. and Cardoso, J.E. (2004) Effect of the melon yellowing-associated virus and whitefly on the carbon fixation, production and solid soluble total of melon fruits. *Revista Ciência Agronômica*, 35, 214–219.
- Takanami, Y. and Kubo, S. (1979) Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. *Journal of General Virology*, 44, 153–159.



# CAPÍTULO 3

---

---

**Construção de clone infeccioso do isolado recombinante brasileiro de  
*Cucurbit aphid-borne yellows virus* por Gibson Assembly**

### **CAPÍTULO 3 - Construção de clone infeccioso do isolado recombinante brasileiro de *Cucurbit aphid-borne yellows virus* por Gibson Assembly**

Os resultados obtidos neste capítulo foram compilados em um artigo e submetidos em uma revista científica internacional com o título '**Construction of an infectious clone of recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil by Gibson Assembly**' contendo como autores Thiago Marques Costa, Lizandra Costa Pereira Brandt, Ayoub Maachi e Tatsuya Nagata.

## RESUMO EXPANDIDO

A virose ‘Amarelão do meloeiro’ é amplamente disseminada nas principais áreas de cultivo do Nordeste, principal região produtora do fruto no país. O ‘Amarelão’ provoca sintomas severos de clorose generalizada na planta, reduzindo a área fotossintética das folhas, o que acarreta redução no teor de açúcar do fruto (Brix). Essa doença é associada principalmente ao isolado recombinante de polerovírus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) e os processos de infecção desse vírus nessa cultura ainda são desconhecidos. Até o momento não há disponível para o produtor estratégias de manejo eficientes contra a doença do ‘Amarelão’. A impossibilidade de inocular o CABYV mecanicamente em planta hospedeira dificulta a caracterização e manutenção do isolado viral. Para isso, uma ferramenta essencial é o clone infeccioso viral. O uso de clones infecciosos viabiliza a realização de trabalhos sem a necessidade de estrutura de criação de insetos e permite a padronização do inóculo e do processo de inoculação, assegurando a homogeneidade do processo de infecção a cada inoculação. Portanto, o objetivo deste estudo foi produzir um clone infeccioso do recombinante brasileiro de CABYV. Para isso, foi utilizado o isolado CABYV-M3. O genoma do CABYV-M3 foi amplificado e clonado através da metodologia de Gibson Assembly. Em seguida, foram selecionados dois clones de CABYV-M3 para avaliar a infecciosidade por agroinoculação em plantas de meloeiro. Após confirmada a infecciosidade em meloeiro, um dos clones de CABYV-M3 foi selecionado para avaliar a suscetibilidade de plantas de cucurbitáceas a esse vírus, como plantas de melão, maxixe, abóbora, abobrinha, pepino e melancia. A detecção do CABYV foi confirmada por sintomatologia, RT-PCR com primers específicos e sequenciamento. No teste inicial, plantas de meloeiro foram suscetíveis aos clones CABYV-M3a e CABYV-M3b obtidos. No círculo de hospedeiro de cucurbitáceas, o CABYV-M1 foi infeccioso em melão Calábria, maxixe e abóbora. Observou-se nas plantas infectadas sintomas de forte clorose internerval nas folhas mais velhas 15 dias após a inoculação (dai) e 30 dai os mesmos sintomas se espalharam pela planta. Os meloeiros infectados apresentaram com 30 dai sintomas de forte amarelecimento semelhantes às plantas com sintomas de “Amarelão de meloeiro” no campo. Portanto, este se trata do primeiro clone infeccioso do CABYV brasileiro recombinante. Além da cultivar goldex de meloeiro, plantas de melão ‘Calábria’, maxixe e abóbora demonstraram-se suscetíveis ao CABYV-M3.

# **Construction of an infectious clone of recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil by Gibson Assembly**

**Thiago Marques Costa, Lizandra Costa Pereira Brandt, Ayoub Maachi, Tatsuya Nagata**

## **3.1. Abstract**

In Brazil, the main viral disease of the melon crop is severe yellowing disease called “Amarelão do Meloeiro”, and a polerovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) is considered one of the etiological agents. This virus is a recombinant virus originated from CABYV and unknown polerovirus. Due to unsuccessful mechanical inoculations of CABYV to host plants, the study of biological characterization is hampered. Therefore, an infectious clone of recombinant isolate of CABYV was constructed using the Gibson Assembly technology in this study. The CABYV cDNA clone produced here was shown to be infectious in cucurbit species such as melon, squash and West Indian gherkin, but not for watermelon. This non-susceptibility in watermelon plants to the infectious clone corroborates the observation of the absence of this virus occurrence in watermelon fields where often located near by the melon plantation.

## **Keywords**

*Cucumis melo*, CABYV, Infectious clone, Gibson Assembly

## **3.2. Introduction**

Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) is a positive-sense RNA virus belonging to the *Polerovirus* genus (Lecoq et al., 1992) of the *Solemoviridae* family. In Brazil, the occurrence of CABYV had been reported in passion fruit plants showing symptoms of such as blisters, mosaic, and leaf deformation (Vidal et al., 2018). Later, a totally different type of CABYV isolate infecting in melon plants showing severe yellowing disease (called “Amarelão do meloeiro” in Brazil) was reported (Costa et al., 2019), since this isolate was recombinant in the coat protein (CP) gene including minor CP gene after ribosomal read-through stop codon (i.e., P3/P5 region). The distribution of this recombinant isolate is very wide from Ceará to Bahia state in Brazil, showing the establishment of this recombinant in melon fields widely in Brazil. In addition, this virus was very peculiar polerovirus hence its transmissibility by whitefly was reported later (Costa et al., 2020). Thus, the name of “cucurbit whitefly-borne yellows virus” (CWBYV) was suggested for this recombinant isolate (Costa et al., 2020).

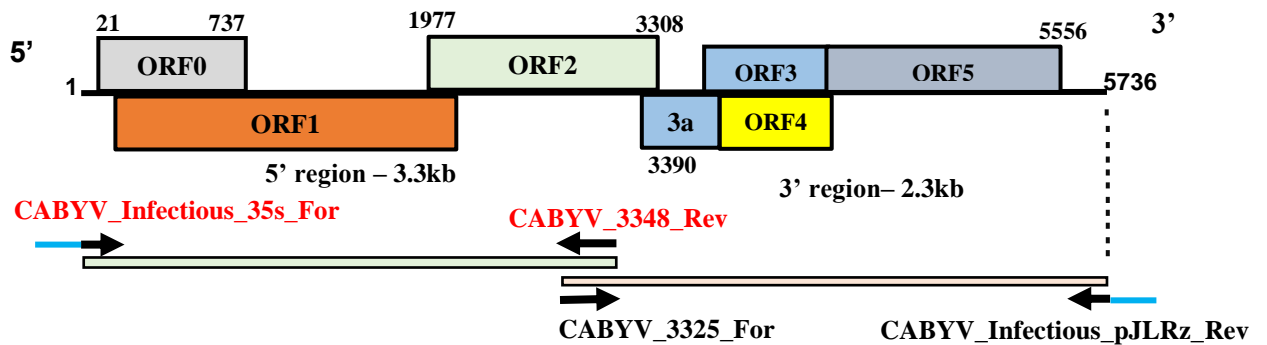
To date, there are no efficient management strategies available to producers against this disease. Considering that the main virus control strategy is based on the use of resistant plants, there are still no melon varieties resistant to this recombinant isolate of CABYV. To develop the resistant or immune variety, the biological characterization of the virus and virus challenge trials to host plants are essential, however, our trials of mechanical inoculation of CWBYV to host and test plants failed (Costa et al., 2019). Hence the construction of infectious clone with full-length genomic cDNA is very important for this virus. Therefore, the objective of this chapter was to produce the infectious clone of the recombinant isolate of CABYV.

### **3.3. Materials and methods**

#### **Obtaining the CABYV-M3 genome in two fragments by RT-PCR for cloning by Gibson Assembly**

For the construction of the infectious clone of CABYV, the M3 isolate, collected in Icapuí county, Ceará state, Brazil, (Costa et al., 2019) was used to prepare cDNA of the genome. The total RNA from CABYV-M3 isolate infected leaves stocked at freezer – 80 °C was extracted using silica resin according to the adapted protocol from Rott and Jelkmann (2001). The cDNA of the complete genome of the CABYV-M3 isolate was amplified in two fragments, the 5' and 3' region, by RT-PCR. For this purpose, cDNA was synthesized by SuperScript (SS) IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) using the specific primer which anneals the genomic 3' end (CABYV\_Infectious\_pJLRz\_Rev: GGA GAT GCC ATG CCG ACC CAC ACC GAA ACG CCA GGG) was used (Fig. 3.1). However, the consequence PCR amplification with primer pair (CABYV\_Infectious pJLRz\_Rev and CABYV\_3325\_For: TCC ATT CTC AAT GAA TTG CGG TC) was not successful in many trials. With the hypothesis that the highly stable secondary structure in the 3' end region of the genome disturbs the PCR, the cDNA synthesis method was changed. First, the poly(A) tail was added in the extracted RNA using Poly(A) polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA), then cDNA was synthesized using oligo dT<sub>50</sub> primer (Costa et al., 2019). With this cDNA, the almost half genome from 3' end of the genome was amplified using LongAmp Taq DNA polymerase (New England Biolabs) using CABYV\_Infectious pJLRz\_Rev and CABYV\_3325\_For primers. To amplify the 5' region of the viral genome, cDNA was synthesized with random primers using SuperScript IV reverse transcriptase and CABYV\_Infectious\_35s\_For (GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA CAA AAG ATA CGA GCG GGT G) and CABYV\_3348\_Rev (AGA CCG CAA TTC ATT GAG AAT G) to amplify the fragments of another half genomic region from

5' end. For the cloning of cDNA of both 5' and 3' regions, these fragments were cloned into pCR4 TOPO plasmid vector (Thermo Fisher Scientific) in *Escherichia coli* strain DH10B (Thermo Fisher Scientific) and cultured at 28 °C. The plasmids were purified from cultured *E. coli* cells using Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, Madison, USA) and sequenced via the Sanger method for the insert cDNA confirmation. The clones with the desired sequences were selected and the genomic region of 5' and 3' were reamplified by PCR for joining the two fragments into one using the “Gibson Assembly” protocol (Blawid and Nagata, 2015). The binary vector backbone was also prepared by PCR using primer pair of pJL89\_Gibson\_rev (CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC) and pJL89\_Gibson\_for (GGG TCG GCA TGG CAT CTC). These three fragments share the same sequence of 20 nts in both 5' and 3' ends to connect with Gibson Assembly. Again, the insert of the selected two plasmids were totally sequenced by Sanger method. *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pMP90 was transformed with the CABYV-M3 construct with cDNA of the full length genome.



**Figure 3.1.** Genomic map of recombinant isolate of CABYV and the scheme of RT-PCR. Blue lines of the primers of 5' and 3' ends show overlap regions with plasmid vector pJL89

### Evaluation of the infectivity of the CABYV-M3 clone obtained by GA

For the first trial to evaluate the infectivity of the CABYV-M3 clones, two CABYV clones in *A. tumefaciens* cells were inoculated according to Blawid and Nagata (2015) in 5 plants of *Cucumis melo* (cv. Goldex) for each clone. As a control, another five melon plants were inoculated with *A. tumefaciens* containing the empty pJL89 vector.

Afterwards, one of the clones was selected to evaluate its infectivity through a host range of cucurbit plants. In this experiment, only the CABYV-M3a clone was used. The following plants were used in this test: two cultivars of squash (*Cucurbita maxima* × *C. moschata* 'Tetsukabuto' and *C. maxima* 'Moranga Coroa'), cucumber (*Cucumis sativus* 'Caipira 201'), watermelon (*Citrullus lanatus* 'Crimson Sweet'), zucchini (*Cucurbita pepo* 'Caserta'), West Indian gherkin (*Cucumis anguria* 'Isla 163') and melon (cv. Calábria of *C. melo*). The melon cv. Goldex (susceptible control) were included again in this test. The virus detection was performed by RT-PCR using primers CABYV\_2663 For (5'-AACGCCCTCGGAATTGATCACC-3') and CABYV\_3728 Rev (5'-TTGCTGAATACAAATGCTTGCATC-3').

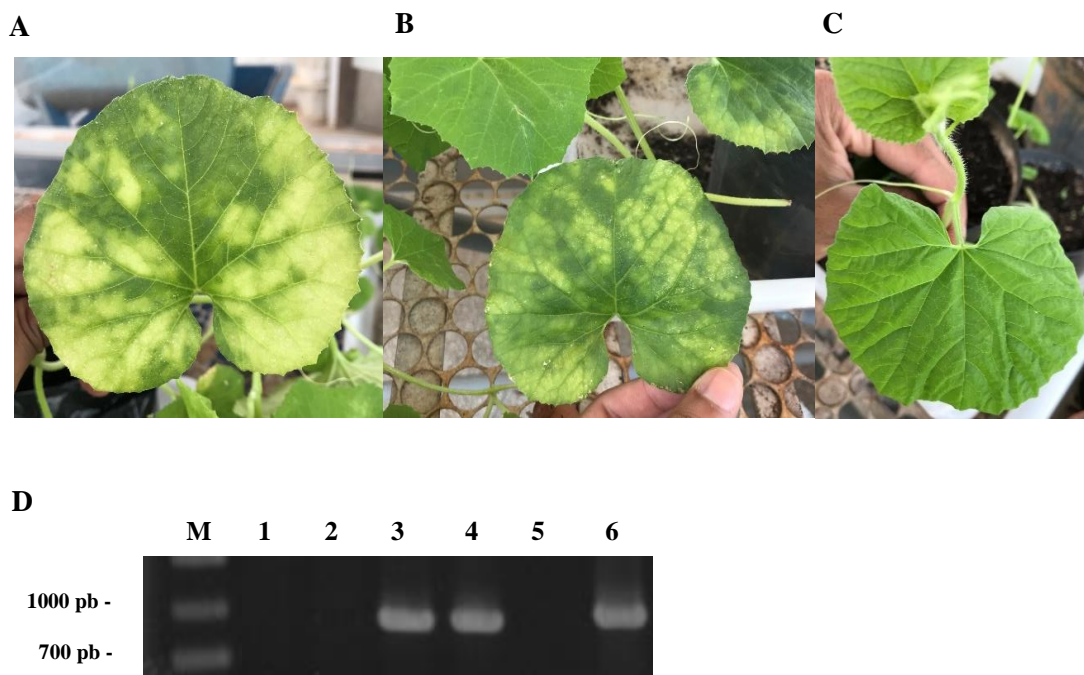
### 3.4. Results and Discussion

As a result, two infectious clones of CABYV-M3, named CABYV-M3a and CABYV-M3b, were obtained. After 7 to 10 days of inoculation, plants agroinfiltrated with the CABYV-M3a and M3b clones showed symptoms of interveinal chlorosis in the inoculated leaves. With more than 15 days, melon leaves showed strong interveinal chlorosis in older leaves (Fig. 3.2A and 3.2B). Control plants were asymptomatic (Fig. 3.2C). The five plants inoculated with the clones CABYV-M3a and CABYV-M3b were separated into two pools for a previous detection and both pools were positive through the test with RT-PCR with specific primers and confirmed by sequencing, showing the infectivity of the clones and control plants were negative in the test (Fig. 3.2D).

The inoculation of CABYV-M3a to test plants for host response study was performed in two independent trials, and at 15 days after inoculation, the upper leaves (not agroinfiltrated) were collected for CABYV-M3a detection by RT-PCR. Of the six cucurbit species tested in the host response experiment, the CABYV-M3a was detected in only three: squash (hybrid of *C. maxima* × *C. moschata*, 7 positive/8 inoculated plants and *C. maxima* 'Moranga Coroa', 6/8), West Indian gherkin (*Cucumis anguria*, 6/6), and melon (cv. Calábria of *C. melo*, 10/12 inoculated and cv. Goldex, 12/12) (Table 3.1). CABYV-M3a infection was not confirmed in cucumber (*C. sativus*), zucchini (*C. pepo*) and watermelon (*C. lanatus*) by RT-PCR nor symptom appearance. Symptoms observed in squash and West Indian gherkin were strong leaf edge chlorosis from 30 dpi. In melon plants (cvs. Goldex and Calábria) the symptoms appeared from 15 dpi and 30 dpi the symptoms were severe, generalized throughout the plant, as observed in melon plants infected in the fields (Table 3.1; Costa et al., 2019).

In previous work done by our group, inoculation of the recombinant isolate of CABYV by whitefly showed that the hybrid squash variety *C. maxima* x *C. moschata* and *C. anguria* were susceptible to this virus (Costa et al., 2020). Therefore, the confirmation of the susceptibility of these plant species to CABYV corroborates our former study (Costa et al., 2019). Furthermore, the non-hybrid squash species *C. maxima* was susceptible to the virus, as well as the hybrid variety of *C. melo* tested in this experiment. The infection of the clone to watermelon plants was not confirmed in this study. This corroborates the observation of the absence of this virus occurrence in watermelon fields where often located near by the melon plantation.

In conclusion, the full-length genomic cDNA clones of CABYV produced using the Gibson Assembly technology are infectious and their infections efficiently happened by the process of agroinfiltration in susceptible cucurbit plants.



**Figure 3.2.** Symptoms in melon plants infiltrated CABYV-M3 clones with 15 dpi. A and B. Chlorosis caused by infections of CABYV-M3a and CABYV-M3b, respectively. The expected amplicon size is 1065 bps. C. Control plants without symptoms. D. Detections of CABYV by RT-PCR. M: size marker, 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific); wells 1 and 2: agroinfiltrated plants with empty vector; wells 3 and 4: agroinfiltrated plants with CABYV-M3a and CABYV-M3b, respectively, wells 5 and 6: negative and positive controls, respectively.



**Table 3.1. Detection of the CABYV-M3a by RT-PCR and Symptoms**

<b>Plants Inoculated</b>				
<b>Species of cucurbits</b>	<b>Common name</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Detection<sup>a</sup></b>	<b>Symptoms</b>
<i>Cucumis anguria</i>	West Indian gherkin	Isla 163	6/6	Strong leaf edge chlorosis
<i>Cucumis melo</i>	Melon	Goldex	12/12	Severe yellowing symptoms
	Melon	Calábria	10/12	Severe yellowing symptoms
<i>Cucurbita pepo</i>	Zucchini	Caserta	0/12	
<i>Cucumis sativus</i>	Cucumber	201 Caipira	0/8	
<i>Cucurbita maxima</i>	Squash	"Moranga Coroa"	6/8	Strong leaf edge chlorosis
<i>Cucurbita maxima</i> x <i>Cucurbita moschata</i>	Squash	Tetsukabuto F1	7/8	Strong leaf edge chlorosis
<i>Citrullus lanatus</i>	Watermelon	Crimson Sweet	0/6	

<sup>a</sup>Number of positive plants in virus detection/number of total inoculated plants

### 3.5. References

- Blawid, R., & Nagata, T. (2015). Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *Journal of virological methods*, 222, 11-15.
- Costa, T. M., Inoue-Nagata, A. K., Vidal, A. H., Ribeiro, S. D. G., & Nagata, T. (2020). The recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil is a polerovirus transmitted by whiteflies. *Plant Pathology*, 69(6), 1042-1050.
- Costa, T. M., Blawid, R., Aranda, M. A., Freitas, D. M. S., Andrade, G. P., Inoue-Nagata, A. K., & Nagata, T. (2019). Cucurbit aphid-borne yellows virus from melon plants in Brazil is an interspecific recombinant. *Archives of virology*, 164(1), pp. 249-254.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O., Herrbach, E. (1992). A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology*, 41(6), pp. 749-761.
- Lomonosoff, G. P. (2018). So what have plant viruses ever done for virology and molecular biology? *Adv. Virus Res.*, 100, pp. 145-162.
- Rott, M. E., & Jelkmann, W. (2001). Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology*, 107(4), 411-420.
- Vidal, A. H., Sanches, M. M., Alves-Freitas, D. M. T., Abreu, E. F., Lacorte, C., Pinheiro-Lima, B., Ribeiro, S. G. (2018). First World Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus infecting Passionfruit. *Plant disease*, 102(12), pp. 2665-2665.
- Zaidi, S. S. E. A., Tashkandi, M., Mansoor, S., Mahfouz, M. M. (2016). Engineering plant immunity: using CRISPR/Cas9 to generate virus resistance. *Frontiers in plant science*, 7, pp. 1673.

# CAPÍTULO 4

---

---

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA DE cDNA DE MELOEIRO (*Cucumis melo*)

## **CAPÍTULO 4 – Construção de biblioteca de cDNA de meloeiro (*Cucumis melo*)**

### **4.1. Introdução**

A principal estratégia de controle de viroses é baseada no uso de plantas resistentes (inclusive tolerantes e imunes) e, até o momento, não existem disponíveis variedades de meloeiro resistentes ao isolado recombinante de CABYV. Portanto, o estudo de interação de vírus-hospedeiro é prioritário em programas de melhoramento de meloeiro. Entretanto, a caracterização do vírus também é essencial para se conhecer a doença e os fatores envolvidos com a sua incidência. Para isso, nos últimos anos, diversas ferramentas de transgenia e edição genômica, principalmente a tecnologia de CRISPR/Cas, têm sido cada vez mais empregadas para o desenvolvimento de plantas resistentes a vírus de forma mais rápida e eficiente (ZHENGYAN *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2015; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2016; PYOTT *et al.*, 2016; KIS *et al.*, 2019; SHAHRIAR *et al.*, 2021). No entanto, para se desenvolver planta imune a um vírus por engenharia gênica é necessário conhecer os fatores do hospedeiro que interagem com o ciclo de infecção viral. Então, a identificação e caracterização de fatores do hospedeiro (meloeiro) associados ao processo de replicação do CABYV fornecerão informações básicas para viabilizar o desenvolvimento de plantas com a edição gênica de fatores de hospedeiro para o desenvolvimento de plantas imunes à infecção. Os desafios são grandes, pois a interação de genes de replicação de polerovírus com a hospedeira é pouco conhecida. Sabe-se que a proteína P2, a qual contém os domínios RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), é envolvida na replicação do CABYV e é codificada pela ORF2, cujas interações com o hospedeiro são ainda desconhecidas (GUILLEY *et al.*, 1994). Portanto, inicialmente torna-se uma estratégia a produção de uma ferramenta molecular, a biblioteca de cDNA da planta hospedeira no sistema de “yeast two-hybrid system” ou Y2H para o prosseguimento desses estudos. Por isso, o objetivo deste capítulo é produzir uma biblioteca de cDNA de meloeiro (*Cucumis melo*), o principal hospedeiro do isolado recombinante do CABYV.

### **4.2. Material e Métodos**

#### **Preparo do material vegetal**

Para a construção de cDNA de meloeiro (*Cucumis melo*, cv. Goldex), foram utilizados três grupos plantas: (i) plantas sadias, (ii) plantas infectadas pelo clone infeccioso de CABYV-M3 e (iii) plantas infectadas pelo clone infeccioso de MYaV. As plantas infectadas pelo MYaV

foram cedidas a partir do trabalho de construção do clone infeccioso desse vírus da pós-doutoranda Dra. Dione Mendes Teixeira Alvez Freitas.

Então, cerca de 24 plantas de meloeiro foram obtidas, sendo oito para o tratamento de plantas sadias e as outras 16, com cerca de sete dias de crescimento, foram agroinoculadas com os clones infecciosos de CABYV-M3 e MYaV (oito plantas por clone) por *A. tumefaciens*. Após 15 dias da inoculação, *pools* de plantas foram utilizadas para confirmação da infecção por sintomatologia e RT-PCR. Os primers específicos utilizados para a detecção do CABYV-M3 por RT-PCR foram o CABYV\_2663\_For (AACGCCCTCGGAATTGATCACC) e CABYV\_3728\_Rev (TTGCTGAATACAAATGCTTGCATC). Para detectar o MYaV foram usados os primers específicos 5592\_For (ACGAGGTGTTACCCGATAAATTC) e 5822\_Rev (ACCCCAGGTGTGTTTTGATATAC).

Após a confirmação da infecção, somente as folhas mais novas foram coletadas e 20 gramas de cada grupo de plantas foram separadas e armazenadas no ultra freezer a – 80 °C.

### **Extração do RNA total e purificação do RNA mensageiro**

Para a obtenção do RNA total, plantas infectadas por CABYV-M3 (20 g), MYaV (20 g) e sadias (20 g) de meloeiro foram misturadas e maceradas em cadinhos com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foi feita a extração do RNA total utilizando o reagente Quick-zol, de acordo com as indicações do fabricante (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, RS, Brasil). O RNA extraído foi purificado de acordo com ROTT e JELKMANN (2001) e após foi concentrado com o kit RNA Clean & Concentrator<sup>tm</sup>-100 (Zymo Research, Irvine, EUA) e quantificado no Nanoview (Nanoview BioScience, Brighton, EUA).

Para a purificação de RNA mensageiro (mRNA) foi utilizado o kit Dynabeads® mRNA Purification Kit com oligo-dT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), seguindo o protocolo da fabricante. A eluição da fração 1 foi denominado como tubo 1 e de fração 2, como tubo 2. Após, o mRNA total obtido foi quantificado e estocado no ultra freezer para a construção da biblioteca de cDNA.

### **Biblioteca de cDNA de meloeiro**

Para a construção desta biblioteca foi utilizado o kit CloneMiner II cDNA Library Construction (Thermo Fisher Scientific), seguindo as normas da fabricante. A biblioteca de cDNA foi clonada em células competentes de *Escherichia coli* (DH10B) primeiramente no vetor de “entrada” pDONR22 e em seguida transferida por recombinação para o vetor de “destinatário” pDEST22 (vetor de expressão em levedura).

## **Análise da Biblioteca de cDNA**

Para analisar a biblioteca, primeiramente foram selecionadas 10 células de *E. coli* contendo a biblioteca em pDEST22, sendo cinco clones do tubo 1 e cinco do tubo 2. Nesta etapa foi utilizado somente a biblioteca em pDEST22 por ser o vetor final de destinação. Após, o DNA total dos 10 clones foi isolado com o Kit de Miniprep da Promega (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System). Para determinar a titulação da biblioteca de cDNA foi feita a contagem da unidade formadora de colônia por mL (CFU/mL) e para confirmar a eficiência e analisar o tamanho da biblioteca foi feita digestão com a enzima de restrição BsrG1. Por fim, o DNA plasmidial dos clones em pDEST22 foi enviado para sequenciamento via Sanger com o primer pDEST22\_For (TATAACGCGTTTGGGAATCACT).

## **4.3. Resultados**

### **Obtenção do RNA total e do mRNA concentrado**

O RNA total foi extraído por Quickzol e ROTT e JELKMANN (2001) e ainda foi purificado e concentrado com RNA Clean & Concentrator<sup>tm</sup>-100. Por fim, foi obtido um total de RNA de 184,56 µg e 294,74 µg dos tubo 1 e tubo 2, respectivamente (Tab. 4.1). Os tubos 1 e 2 referem-se a “Zymo-Spin<sup>TM</sup> V-E Column w/ Reservoir”, que são colunas utilizadas no protocolo de limpeza e concentração do RNA total extraído. O protocolo indica usar o tubo da segunda fração de eluição (tubo 2), por ter maior quantidade de RNA, porém foi decidido usar os dois tubos da eluição (fração 1 de eluição como tubo 1 e fração 2 como tubo 2) para maior aproveitamento de mRNA.

O RNA total obtido foi utilizado para a obtenção de mRNAs. Para isso, foi utilizado o kit Dynabeads® mRNA Purification Kit e a quantidade total de mRNA dos tubos 1 e 2 foi de 1,093 µg e 0,967 µg, respectivamente (Tab. 4.2).

O mRNA total obtido nos dois tubos foi transferido primeiramente por recombinação com enzima BP Clonase II para o vetor pDORN22, vetor de entrada, e em seguida transferido também por recombinação com enzima LR Clonase II para o vetor pDEST22, vetor de saída.

**Tabela 4.1.** Quantificação do RNA total obtido de meloeiro.

<b>Amostra</b>	<b>Quantificação (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Razão 260/280</b>	<b>Razão 260/230</b>	<b>RNA Total</b>
Melão (tubo 1)	0,894	2,097	2,201	184,56 $\mu\text{g}$
Melão (tubo 2)	1,059	1,221	1,321	294,74 $\mu\text{g}$

**Tabela 4.2.** Quantificação do mRNA total obtido de meloeiro.

<b>Amostra</b>	<b>RNA Total</b>
Melão (tubo 1)	1,093 $\mu\text{g}$
Melão (tubo 2)	0,967 $\mu\text{g}$

#### **Recombinação e caracterização da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDORNR22 e transformação em *E. coli* (DH10B)**

Para avaliar a qualidade da biblioteca de cDNA de meloeiro foi feita a titulação a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) por testes de plaqueamento de três diluições: 1:100, 1:1000 e 1:10000. A reação controle foi feita com o vetor pEXP7-tet nas mesmas diluições. Para considerar uma biblioteca de titulação eficiente é necessária uma CFU acima de  $10^6$ . A CFU foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{cfu/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias na placa} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume plaqueado (mL)}}$$

A partir da transformação em pDORN22, referente o tubo 1, foram contadas 678, 338 e 12 colônias e para o tubo 2, 724, 338 e 7 colônias nas diluições 1:100, 1:1000 e 1:10.000, respectivamente (Tab. 4.3; Fig. 4.1A e B). A titulação final obtida para a biblioteca de cDNA foi de  $2,1 \times 10^7$  para o tubo 1 e  $5,7 \times 10^7$  para o tubo 2, sendo consideradas eficientes. Em seguida foi obtido o cDNA plasmidial total de pDORN22 com o objetivo de transferi-lo por recombinação para o plasmídeo pDEST22, que é o vetor de expressão em levedura.

**Tabela 4.3.** Titulação da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDORN22.

Amostra	Diluição	Colônias por placa	Titulação (cfu/mL)	Média	Volume Total	CFU Total
Controle Negativo BP	Sem diluição	63	6,3			
	1:10	3	$3 \times 10^2$			
	1:100	0	Zero			
pEXP7-tet (BP Controle Positivo)	1:100	107	$1,07 \times 10^5$	$2,39 \times 10^5$	12mL	$2,8 \times 10^6$
	1:1000	21	$2,1 \times 10^5$			
	1:10.000	4	$4 \times 10^5$			
Biblioteca 1 tubo 1	1:100	678	$0,678 \times 10^6$	$1,75 \times 10^6$	12mL	$2,1 \times 10^7$
	1:1.000	338	$3,38 \times 10^6$			
	1:10.000	12	$1,2 \times 10^6$			
Biblioteca 2 tubo 2	1:100	724	$0,724 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	12mL	$5,7 \times 10^7$
	1:1.000	338	$3,38 \times 10^6$			
	1:10.000	7	$0,7 \times 10^6$			

#### **Transferência da biblioteca de cDNA de meloeiro de pDORN22 para pDEST22 e transformação em *E. coli* (DH10B)**

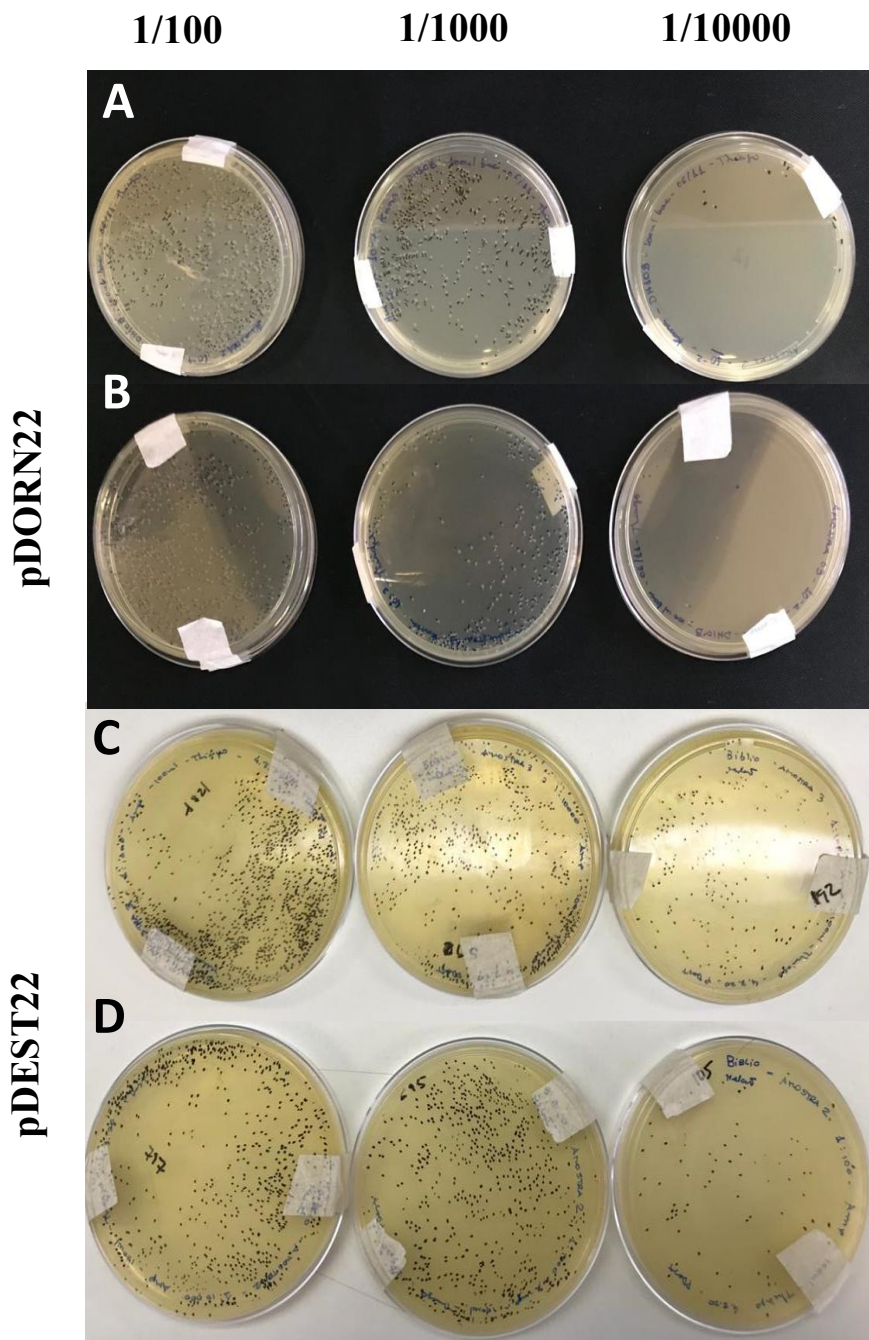
Foi feita a transferência da biblioteca em pDORN22 para pDEST22 por recombinação. Neste experimento, foram utilizadas as mesmas diluições (1:100, 1:1000 e 1:10000) do teste anterior para avaliar a titulação. Para o controle do experimento foi utilizado, na recombinação e transformação em *E. coli*, o vetor pENTR-Gus.

Respectivamente, as colônias contadas da biblioteca em pDEST22 nas titulações 1:100, 1:1000 e 1:10.000 foram de 797, 695 e 105, para o tubo 1, e 1258, 592 e 192, para o tubo 2 (Tab. 4.4; Fig. 4.1C e D). A média das titulações nas mesmas diluições foram de  $6 \times 10^6$  para o tubo 1, e  $8,8 \times 10^6$ , para o tubo 2. O resultando total da CFU para os tubos 1 e 2, respectivamente, foram de  $7,2 \times 10^7$  e  $10,5 \times 10^7$ , resultando em valores acima do considerado para uma biblioteca eficiente, que é no mínimo de um quociente a  $10^6$ .



**Tabela 4.4.** Titulação da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDEST22.

<b>Amostra</b>	<b>Diluição</b>	<b>Colônias por placa</b>	<b>Titulação (cfu/mL)</b>	<b>Média</b>	<b>Volume Total</b>	<b>CFU Total</b>
Controle Negativo LR	Sem diluição	22	$2,2 \times 10^2$			
	1:10	0	Zero			
	1:100	0	Zero			
pEXP22-GUS (LR Controle Positivo)	1:100	10	$1,0 \times 10^5$	$7 \times 10^5$	12mL	$8,4 \times 10^6$
	1:1.000	-	-			
	1:10.000	13	$13 \times 10^5$			
Biblioteca 1 (tubo 1)	1:100	797	$0,797 \times 10^6$	$6 \times 10^6$	12mL	$7,2 \times 10^7$
	1:1.000	695	$6,95 \times 10^6$			
	1:10.000	105	$10,5 \times 10^6$			
Biblioteca 2 (tubo 2)	1:100	1258	$1,258 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	12mL	$10,5 \times 10^7$
	1:1.000	592	$5,92 \times 10^6$			
	1:10.000	192	$19,2 \times 10^6$			

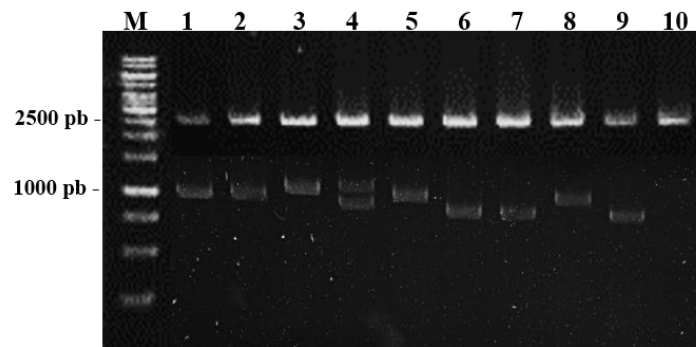


**Figura 4.1.** Biblioteca de cDNA de meloeiro em pDORN22 e pDEST22. A e B referentes ao tubo 1 e 2, respectivamente: diluições 1/100, 1/1000 e 1/10000 das células provenientes da transformação do cDNA em pDORN22. C e D referentes ao tubo 1 e 2, respectivamente: diluições 1/100, 1/1000 e 1/10000 das células provenientes da transformação do cDNA em pDEST22.

### **Análise da biblioteca de cDNA em pDEST22 por digestão e sequenciamento via Sanger**

Para maior eficiência, o tamanho médio dos insertos deve ficar entre 0,5 e 1,7 kb. Foram analisados por digestão pela enzima BsrGI 10 clones em pDEST22, sendo cinco clones do tubo 1 e cinco do tubo 2. Observou-se a partir do gel da digestão um tamanho médio dos insertos de 1,18 kb e de 0,75 kb para as amostras 1 e 2, respectivamente (Fig. 4.2; Tabela 4.5). Intervalo de tamanho do inserto variou de 0,9 a 1,9 kb, para amostra 1, e para amostra 2 de 0,7 a 0,9 kb (Tabela 4.5). Dos 10 clones analisados, apenas um não apresentou inserto, representando uma porcentagem de recombinantes de 90 % de eficiência. Portanto, dos 10 clones, somente nove foram enviados para sequenciamento

Os nove clones apresentaram sequências com alta similaridade com sequências de *Cucumis melo* depositadas no GenBank, indicando que a construção da biblioteca cDNA de meloeiro foi eficiente (Tabela 4.6). Na tabela 4.6 pode-se observar os genes identificados, que são associados com: a E3 ubiquitina-proteína ligase putativa (clone 1), proteína 40S ribossômica AS-LIKE (clone 2), proteína 1 de transferência de lipídios não específica (clone 3), proteína 28 associada à classificação de proteína vacuolar homóloga 2 (clone 4), cadeia leve de dineína 1(citoplasmática; clone 5), proteína potenciadora de evolução de oxigênio 3-2 (cloroplástica; clone 6), subunidade VI do centro de reação do fotossistema I, (cloroplástica, clone 7), proteína lúmenal tilacóide de 16,5 kDa, (cloroplástica; clone 8) e subunidade 4 da RNA polimerase II dirigida por DNA (clone 9). A busca por similaridade das sequências em nucleotídeo (Blastn) e aminoácido (Blastx) dos clones com outras sequências do GenBank demonstrou porcentagem de identidade que variou de 98 a 100% para Blastn e 92 a 100% para Blastx (Tabela 4.6).



**Figura 4.2.** Digestão com BsrGI de 10 amostras da biblioteca de cDNA em pDEST22. M: marcador; poços de 1 a 5: clones do tubo 1; poços de 6 a 10: clones do tubo 2.

**Tabela 4.5.** Tamanho da banda e do inserto em Kb a partir da digestão por BsrGI de clones da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDEST22.

Clone	Tamanho aproximado da banda (Kb)	Tamanho aproximado do inserto (Kb)
1	1	1
2	1	1
3	1,1	1,1
4	1,1 + 0,8	1,9
5	0,9	0,9
6	0,7	0,7
7	0,7	0,7
8	0,9	0,9
9	0,7	0,7
10	-	-

**Tabela 4.6.** Sequenciamento de clones da biblioteca de cDNA de meloeiro em pDEST22.

Clone	Gene de <i>C. melo</i>	Acesso (GenBank)	Blastn	Blastx
1	<i>Putative E3 ubiquitin-protein ligase</i>	XM_008465918.2	99.39%	97.71%
2	<i>Protein 40S ribosomal AS-LIKE</i>	XM_008464843.2	100%	100%
3	<i>Non-specific lipid-transfer protein 1-like</i>	XM_008444102.2	100%	100%
4	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog 2</i>	XM_008441676.2	100%	100%
5	<i>Dynein light chain 1, cytoplasmic-like</i>	XM_008444280.2	99.16%	100%
6	<i>Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic</i>	XM_008443412.2	100%	92.59%
7	<i>Photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic</i>	XM_008449290.2	100%	100%
8	<i>Thylakoid lumenal 16.5 kDa protein, chloroplastic</i>	XM_008459222.2	99.51%	100%
9	<i>DNA-directed RNA polymerase II subunit 4</i>	XM_008458573.2	98.35%	98.34%

#### 4.4. Discussão

Os tubos 1 e 2, que originaram as bibliotecas 1 e 2, foram originados a partir da fração de eluição na coluna de oligo-dT, Dynabeads® mRNA Purification Kit. O protocolo da fabricante sugere utilizar o produto da eluição final (fração 2), porém neste estudo decidiu-se usar o produto das duas frações a fim de se aproveitar ao máximo o mRNA obtido. Como resultado, as bibliotecas de cDNA obtidas a partir das duas frações contendo mRNAs apresentaram eficiência e rendimento altos, com resultados acima do valor mínimo de cópias de clones sugerido pela fabricante.

Para a construção da biblioteca de cDNA de meloeiro foram utilizadas folhas jovens de plantas infectadas e sadias para se obter mRNAs expressos em condições sem vírus (sadia) e de infecção viral. Essa estratégia foi utilizada visando enriquecer a variabilidade da biblioteca de cDNA a partir de mRNAs expressados que possivelmente se envolvem com o processo de infecção do vírus (ABBINK *et al.*, 2002; CLEPET *et al.*, 2011; CUI *et al.*, 2018). Neste trabalho, foram utilizadas plantas infectadas pelo CABYV-M3 e pelo MYaV a fim de se determinar os fatores de hospedeiros desses dois vírus em estudos posteriores. Esses dados serão importantes para a elucidação da infecção dos dois principais vírus da cultura do meloeiro da região Nordeste do Brasil.

Todos os 10 clones sequenciados das bibliotecas 1 e 2 apresentaram sequência com similaridade a sequências de *C. melo* depositadas no GenBank. Não foi observado na literatura de pesquisa associação dos genes sequenciados aqui com o desempenho de defesa de meloeiro

ou outras espécies de planta contra polerovírus. Dos genes analisados desta biblioteca, os que já foram associados com o mecanismo de defesa de planta contra patógenos são: *Putative E3 ubiquitin-protein ligase* e *Oxygen-evolving enhancer protein 3-2*. Em *Arabidopsis spp.*, a *E3 ubiquitina ligase* já foi associada por aliciar e desempenhar papéis importantes na defesa contra patógenos (MARINO *et al.*, 2012). A *Putative E3 ubiquitin-protein ligase*, também denominada ubiquitina ligase, tem como função principal ligar uma ou mais moléculas de ubiquitina a proteínas alvo específicas e são fatores-chave que determinam a especificidade do substrato (ZHANG *et al.*, 2017). Já foi observado que a expressão da proteína *Oxygen-evolving enhancer 3-2* é reduzida em folhas infectadas por tobacco mosaic virus, o que pode facilitar o processo de infecção desse vírus (LEHTO *et al.* 2003; HAN *et al.*, 2014), que, na planta, está envolvida no sistema de fotossistema II.

Têm-se poucos dados a respeito do processo de interação de genes de replicação de polerovírus com a hospedeira. Até então é sabido que a proteína P2, a qual contém os domínios RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e Helicase (Hel), é envolvida na replicação do CABYV e é codificada pela ORF2, cujas interações com o hospedeiro são ainda desconhecidas (GUILLEY *et al.*, 1994).

Portanto, a próxima etapa do projeto terá como objetivo identificar os fatores de hospedeiro de meloeiro que interagem com o processo de replicação do CABYV e MYaV. Para isso, será utilizado o sistema de duplo híbrido em levedura (Y2HS) em que a proteína de replicação do CABYV (P2 – RdRp e Hel) e MYaV (proteína Rep do ORF1) serão utilizadas como isca e a biblioteca de cDNA de meloeiro como presa.

## Conclusões gerais da Tese

- O CABYV recombinante brasileiro é transmitido por moscas brancas de meloeiro para meloeiro.
- O CABYV recombinante brasileiro não é transmitido pelo afídeo *Aphis gossypii*.
- Plantas de abóbora, maxixe e melão cv. TGR-1551 (resistente ao isolado espanhol de CABYV) são suscetíveis à infecção do CABYV isolado M1 por transmissão por mosca branca, enquanto plantas de pepino, alface, melancia, feijão e beterraba são imunes.
- Como o termo “aphid-borne” não é adequado, e tendo em vista que os genes P3 e P5 dos isolados recombinantes do CABYV compartilham menos de 90% de identidade de aminoácidos com os dos isolados originais do CABYV, propomos a classificação desse vírus como uma nova espécie sugerida como Cucurbit whitefly-borne yellows virus (CWBYV).
- Os clones de cDNA genômico completo de CABYV (CABYV-M3a e CABYV-M3b) produzidos a partir da tecnologia de Gibson Assembly são infecciosos.
- A infecção dos clones infecciosos de CABYV foi eficiente pelo processo de agroinfiltração nas cucurbitáceas de melão cv. calábria, maxixe e abóbora, enquanto as cucurbitáceas de abobrinha, pepino e melancia foram imunes.
- As bibliotecas de cDNA de meloeiro obtidas a partir das duas frações contendo mRNAs apresentaram alto rendimento.

#### 4.5. Referências

- ABBINK, T. E.; PEART, J. R.; MOS, T. N.; BAULCOMBE, D. C.; BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. 2002. Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology*, 295(2), 307-319.
- CLEPET, C.; JOOBEUR, T.; ZHENG, Y.; JUBLOT, D.; HUANG, M.; TRUNIGER, V.; FEI, Z. 2011. Analysis of expressed sequence tags generated from full-length enriched cDNA libraries of melon. *BMC genomics*, 12(1), 1-12.
- CUI, X.; LU, L.; WANG, Y.; YUAN, X.; CHEN, X. 2018. The interaction of soybean reticulon homology domain protein (GmRHP) with Soybean mosaic virus encoded P3 contributes to the viral infection. *Biochemical and biophysical research communications*, 495(3), 2105-2110.
- GUILLEY, H.; WIPF-SCHEIBEL, C.; RICHARDS, K.; LECOQ, H.; JONARD, G. 1994. Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology*, 202(2), 1012-1017.
- HAN, Y.; LUO, Y.; QIN, S.; XI, L.; WAN, B.; DU, L. 2014. Induction of systemic resistance against tobacco mosaic virus by Ningnanmycin in tobacco. *Pesticide biochemistry and physiology*, 111, 14-18.
- KIS, A.; HAMAR, É.; THOLT, G.; BÁN, R.; HAVELDA, Z. 2019. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant biotechnology journal*, 17(6), 1004.
- LEHTO, K.; TIKKANEN, M.; HIRIART, J. B.; PAAKKARINEN, V.; ARO, E. M. 2003. Depletion of the photosystem II core complex in mature tobacco leaves infected by the flavum strain of tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1135-1144.
- MARINO, D.; PEETERS, N.; RIVAS, S. 2012. Ubiquitination during plant immune signaling. *Plant physiology*, 160(1), 15-27.
- ROTT, M. E.; JELKMANN, W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, n. 4, p. 411-420.
- SHAHRIAR, S. A.; ISLAM, M. N.; CHUN, C. N. W.; RAHIM, M.; PAUL, N. C.; UDDAIN, J.; SIDDIQUEE, S. 2021. Control of plant viral diseases by CRISPR/Cas9: resistance mechanisms, strategies and challenges in food crops. *Plants*, 10(7), 1264.
- ZHANG, M.; ZHANG, G. Q.; KANG, H. H.; ZHOU, S. M.; WANG, W. 2017. TaPUB1, a putative E3 ligase gene from wheat, enhances salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Plant and Cell Physiology*, 58(10), 1673-1688.