



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

PRIMEIRO RELATO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO CARLA VÍRUS POTATO VIRUS P EM TOMATEIRO

PAULA RODRIGUES NEVES

Brasília -DF

2022

PAULA RODRIGUES NEVES

**PRIMEIRO RELATO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
CARLA VÍRUS POTATO VIRUS P EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Fitopatologia.

ORIENTADORA

ALICE KAZUKO INOUE NAGATA

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

BRASIL

2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Helena Neves Rodrigues e José Rodrigues Nogueira, pelo amor e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora Alice Kazuko Inoue Nagata pela dedicação, paciência e por ter acreditado em mim nessa etapa da minha vida. Foram momentos muito gratificantes na minha vida profissional e pessoal;

Meu muito obrigado por todos integrantes do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças;

Meu agradecimento especial ao João Marcos Fagundes Silva pela contribuição com as análises e desenvolvimento do trabalho;

Aos professores da pós-graduação do Departamento de Pós Graduação em Fitopatologia, por compartilharem suas experiências profissionais e conhecimento;

Aos membros da banca examinadora, Dr^a. Rita de Cássia Pereira Carvalho, Dr. Milton Luiz da Paz Lima e Dr^a Thaís Ribeiro Santiago pela disponibilidade para contribuir neste trabalho com sugestões e críticas.

Ao programa de Pós-graduação em Fitopatologia da UnB pela oportunidade concedida;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

À Embrapa Hortaliças por fornece a infraestrutura necessária durante a realização deste trabalho;

E a todos que fizeram parte da minha vida e foram importantes nas minhas escolhas.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
Objetivo Geral.....	10
Objetivos específicos	10
REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 Tomateiro.....	11
1.2 Doenças de origem viral	11
1.3 Família <i>Betaflexiviridae</i>	14
1.4 <i>Potato Virus P</i>	15
MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Processamento da amostra e sequenciamento.....	17
2.2 Montagem de HTS	18
2.3 Análises filogenéticas	18
2.4 Análise de recombinação	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 Análise de HTS.....	19
3.2 Comparação das sequências.....	22
3.3 Análise de recombinação	25
3.4 Análise filogenética	26
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXO I	39

RESUMO

As perdas causadas por doenças impactam de forma considerável a cultura do tomateiro. Dentre elas, as doenças virais destacam-se pela dificuldade de controle, resultando em redução da produtividade e aumento do custo de produção. Nos últimos anos, com auxílio da técnica de sequenciamento de alta performance, incluindo o *High Throughput Sequencing* – HTS, vírus novos vêm sendo descritos, sendo que muitos deles podem potencializar as perdas em tomateiro. Esse estudo tem como objetivo a caracterização molecular de um carlavírus identificado a partir de sequenciamento HTS, utilizando a plataforma *Illumina HiSeq2000*. Amostras de tomateiro coletadas no Rio Grande do Sul no ano de 2014 foram avaliadas. Detectou-se, nessas amostras, um vírus ainda não relatado em tomateiro, além de dois outros vírus já conhecidos. Focou-se no estudo deste vírus distinto. Análises envolveram a avaliação da qualidade dos ‘reads’, a montagem da sequência genômica, a determinação da estrutura genômica e análise de recombinação e relacionamento filogenético com outros vírus. Foi confirmado que o vírus é classificado como membro da espécie *Potato virus P*, do gênero *Carlavirus*. Verificou-se que isolados de potato virus P (PVP) foram anteriormente descritos infectando a batateira no Brasil, Argentina e Rússia. O vírus detectado em tomateiro é mais semelhante ao isolado russo com 95,55 % de identidade de nucleotídeos do genoma. A organização genômica é típica de um carlavírus com 6 ORF’s, sendo a sequência determinada incompleta, faltando a extremidade terminal 5’ e 3’. Na análise filogenética, o PVP de tomateiro foi agrupado com os demais isolados de PVP de batateira. Não foi detectada evidência de eventos de recombinação no genoma do PVP de tomateiro. Este é o primeiro relato do PVP em infecção natural em tomateiro, sendo que estudos adicionais serão necessários para avaliar os potenciais danos que esse vírus pode causar ao tomateiro.

Palavras chaves: NGS; HTS; tomate; *Solanum lycopersicum*; doença; PVP.

ABSTRACT

Losses caused by diseases have a considerable impact on the tomato crop. Among them, viral diseases are particularly important due to the difficulty on their control, resulting in yield reduction and increased production cost. This study aims at the molecular characterization of a carlavirus identified by *High Throughput Sequencing* -HTS, using the *Illumina* HiSeq2000 platform. Tomato samples collected in Rio Grande do Sul state in 2014 were evaluated. A virus still unreported in tomato plants was detected in these samples, in addition to two other known viruses. The focus of this work was in this distinct virus. Analyzes involved the evaluation of the reads quality, assembling of the genomic sequence, determining the genomic structure, and analyzing the recombination and phylogenetic relationship with other viruses. It has been confirmed that the virus is classified as a member of the species *Potato virus P*, of the genus *Carlavirus*. Potato virus P (PVP) isolates were previously described infecting potato in Brazil, Argentina and Russia. The virus detected in tomato is more similar to the Russian isolate with 95.55 % genome nucleotide identity. The genomic organization is typical of a carlavirus with 6 ORF's, and the determined sequence was incomplete, lacking the 5' and 3' terminal ends. In the phylogenetic analysis, tomato PVP was grouped with other potato PVP isolates. No evidence of recombination was detected in the tomato PVP isolate. This is the first report of PVP in natural infection in tomato plants, and further studies are needed to assess the potential damage that this virus causes to tomato plants.

Keywords: NGS; HTS; tomato; *Solanum lycopersicum*; disease; PVP.

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma cultura de grande relevância econômica para o Brasil, com uma produção de 3.753.595 toneladas no ano de 2021 e posicionado no 10º lugar no ranking mundial da produção de tomate (FAOSTAT, 2020).

As doenças são de extrema importância na limitação da produção da cultura, sendo causadas por diversos grupos de patógenos como vírus, nematoides, fungos e bactérias (LOPES, CARLOS ALBERTO.ÁVILA, 2021). Dentre as doenças emergentes na cultura do tomateiro nos últimos anos, houve um relato da ocorrência de duas espécies do gênero *Carlavirus* em tomateiro, o *Potato virus M* e *Potato virus S* (CHAUDHARY *et al.*, 2018), o que chamou a atenção para a potencial importância de vírus deste gênero na cultura. Até o presente, não há relato de carlavírus infectando o tomateiro no Brasil, embora há relato dos carlavírus potato virus M (GRIECO *et al.*, 1997) e potato virus S (CHAUDHARY *et al.*, 2018) em outras regiões do mundo.

O potato virus P (PVP) foi descrito no Brasil no ano de 1993 (DANIELS *et al.*, 1993) e na Argentina no ano de 1996 (BUTZONITCH, *et al.*, 1996). Mais recentemente, o PVP foi descrito na Rússia em batateira (YANAGISAWA *et al.*, 2019). Devido aos estudos genômicos em dois carlavírus então classificados em espécies diferentes, *Potato virus P* e *Potato rough dwarf virus*, foi possível concluir que se tratava de isolados da mesma espécie que hoje é nomeada como *Potato virus P* (MASSA *et al.*, 2008; (NISBET *et al.*, 2006).

Trabalhos com testes de inoculação mecânica de isolados de PVP encontrados na década de 90 mostraram que as espécies; *Datura meteloides*, *D. metel*, *Solanum lycopersicum* cv. Moneymarker, *Nicotiana benthamiana*, *Nicandra physalodes*, *Nicotiana debneyi*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. bigelovii*, *N. edwardsonii*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. megalosiphon*, *Solanum demissum*, *S. tuberosum*, *D. stramonium* e *Petunia hybrida* foram relatadas como suscetíveis, sendo a grande maioria infectada de forma assintomática; os principais sintomas da infecção de

PVP em batata são nanismo, deformação foliar e rugosidade (MASSA *et al.*, 2008; NISBET *et al.*, 2006).

Este trabalho de dissertação tem o objetivo de relatar pela primeira vez a ocorrência de PVP em tomateiro e realizar análise molecular genômica.

Objetivo Geral

Caracterizar molecularmente um isolado de *Potato virus P* de tomateiro.

Objetivos específicos

- Identificar sequências virais de PVP em banco de dado do NCBI de sequências oriundas de sequenciamento de alto rendimento (HTS) por *Illumina* Hiseq2000;
- Analisar o genoma do isolado de PVP de tomateiro e comparar com outros isolados derivados de batata;
- Realizar análise de recombinação do genoma do isolado de PVP de tomateiro;
- Analisar o relacionamento filogenético do isolado de PVP de tomateiro com representantes do gênero *Carlavirus*.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Tomateiro

O tomateiro tem seu centro de origem na região andina e, após a colonização dessa região por europeus, foi levado para outros continentes (RANJAN *et al.*, 2012). O tomate é produzido e apreciado em praticamente todo mundo, sendo consumido tanto *in natura* como processado, em forma de polpas, ketchup, sopas, extratos e molhos prontos. O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) faz parte da família botânica Solanaceae, contendo plantas de grande importância como batata (*S. tuberosum*), berinjela (*S. melongena*) e pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) (BERGOUGNOUX, 2014).

Atualmente, segundo dados da (Food and Agriculture Organization of United Nations) (FAOSTAT, 2021) os três maiores produtores de tomate são China (64.768.148 t), Índia (20.573006 t) e Turquia (13.204.015 t). O Brasil ocupa a décima posição no ranking de produção mundial de tomate com 3.753.595 t.

1.2 Doenças de origem viral

As perdas culturais no tomateiro têm como o principal fator as doenças, sejam de origem biótica ou abiótica. Os agentes causais das doenças bióticas são principalmente fungos, nematoides, vírus e bactérias, no qual fatores como clima, método de irrigação, qualidade da semente, população de microrganismos no solo patogênicos e não patogênicos, estado nutricional da planta, entre outros, são de extrema importância para o desenvolvimento das doenças e disseminação dos patógenos (LOPES & ÁVILA, 2021).

Um dos grandes fatores complicadores do cultivo é o monocultivo, no qual a diversidade genética é baixa, aumentando assim a oportunidade de propagação e dispersão dos patógenos, levando a danos elevados (RUBIO *et al.*, 2020).

Os vírus são particularmente importantes na cultura do tomateiro, tanto os vírus constituídos de material genético de DNA como de RNA, sendo os principais classificados nos gêneros *Begomovirus* e *Curtovirus* (vírus de DNA); *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Potyvirus*, *Tombusvirus*, *Torradovirus*, *Alfamovirus*, *Cucumovirus* e *Orthotospovirus* (vírus de RNA) (ONG *et al.*, 2020). No Brasil, o tomateiro é afetado por diversas viroses (Tabela 1), podendo causar perdas severas para a produção (LOPES & ÁVILA, 2021).

Tabela 1. Listagem das principais doenças relatadas em tomate no Brasil (LOPES & ÁVILA, 2021)

	Espécie do agente causal
Doenças virais	
Mosaico- dourado do tomateiro	espécies do gênero <i>Begomovirus</i>
Amarelão do tomateiro	<i>Tomato chlorosis virus</i>
Fogo mexicano	<i>Potato virus Y</i>
Mosaico-amarelo	<i>Pepper yellow mosaic virus</i>
Mosaico do tomateiro	<i>Tomato mosaic virus</i> e <i>Tobacco mosaic virus</i>
Mosaico do pepino	<i>Cucumber mosaic virus</i>
Necrose-branca do tomateiro	<i>Tomato blistering mosaic virus</i>
Mancha em anel do pimentão	<i>Pepper ringspot virus</i>
Vira cabeça do tomateiro	<i>Tomato spotted wilt virus</i> e <i>Groundnut ringspot virus</i>

As doenças virais são controladas principalmente de maneira preventiva, geralmente direcionado ao manejo dos principais vetores e plantas daninhas que podem servir como reservatório, sendo que a utilização de plantas com resistência é bastante empregada (RUBIO *et al.*, 2020), como por exemplo o mosaico-dourado do tomateiro que é causado por mais de uma espécie de begomovírus. Dentre os begomovírus os de maior importância no Brasil são aqueles classificados nas espécies *Tomato severe rugose virus* e *Tomato mottle leaf curl virus*. O vírus é transmitido pela mosca branca (*Bemisia tabaci*) de forma persistente. Plantas daninhas ou plantas cultivadas próximas, principalmente as solanáceas, podem servir de reservatório do vírus. No cultivo é importante usar sementes certificadas e mudas livres de mosca-branca. O uso de inseticidas é realizado principalmente após o transplante, onde as mudas jovens são mais sensíveis a infecção. Plantas resistentes ou tolerantes são recomendadas para implementação da cultura (LOPES & ÁVILA, 2021).

A ocorrência de carlavírus é observada de forma esporádica na cultura do tomateiro, por exemplo como este relato na Itália (GRIECO, *et al.*, 1997). Na Índia, as espécies *Potato virus S* e *Potato virus M* foram relatadas (CHAUDHARY *et al.*, 2018). Esses relatos foram feitos principalmente com base em análises de sequenciamento de alto rendimento (*High-throughput sequencing* - HTS). Geralmente, sintomas não foram observados ou ocorrem em infecções mistas, no qual a diagnose acaba sendo feita apenas com a espécie viral que é rotineiramente detectada (CHAUDHARY *et al.*, 2018). A avaliação do efeito de um vírus em uma infecção mista é complexa, podendo ocorrer desde o sinergismo ao neutralismo e ao antagonismo dos vírus envolvidos (MORENO & LÓPEZ-MOYA, 2019) Os representantes da família *Betaflexiviridae*, que incluem os carlavírus, tendem a causar sintomas mais brandos e muitas vezes assintomáticos, mas infecções mistas podem potencializar as perdas da cultura (HAMMOND *et al.*, 2020).

1.3 Família *Betaflexiviridae*

A família *Betaflexiviridae* faz parte da ordem *Tymovirales*, junto com as famílias *Alphaflexiviridae*, *Deltaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae* e *Tymoviridae*. A família *Betaflexiviridae* é subdividida em duas subfamílias: *Quinvirinae* e *Trivirinae*. A subfamília *Quinvirinae* é formada pelos gêneros *Banmivirus* (1 espécie), *Carlavirus* (62 espécies), *Foveavirus* (10 espécies), *Robigovirus* (5 espécies) e *Sustrivirus* (1 espécie), enquanto a *Trivirinae* pelos gêneros *Capillovirus* (5 espécies), *Chordovirus* (2 espécies), *Citrivirus* (1 espécie), *Divavirus* (3 espécies), *Prunevirus* (4 espécies), *Ravavirus* (1 espécie), *Tepovirus* (5 espécies), *Tichovirus* (10 espécie), *Vitivirus* (17 espécies) e *Wamavirus* (1 espécie) (ICTV, 2022).

A partícula viral dos vírus dessa família é alongada e flexuosa (Figura 1^a), com 12-13 nm de diâmetro e 600-1000 nm de comprimento, variável de acordo com o gênero. A partícula não é envelopada e é formada por genoma de ssRNA (+) linear de 6,5-9 kb, tendo na posição 3' terminal uma cauda Poly(A). O genoma é composto por 2 – 6 ORF's ('Open Reading Frame') (Figura 1B). A ORF1 está relacionada à replicação (Rep), sendo responsável pela expressão de metiltransferase (Mtr), helicase (Hel) e RNA dependente de RNA polimerase (RdRp ou Rep). A ORF2, ORF3 e ORF4 formam o bloco de gene triplo (TGB), que está relacionado ao movimento viral e a ORF5 corresponde ao gene da capa proteica (CP) (KONDO *et al.*, 2021). A ORF6 codifica uma proteína rica em cisteína (HULL, 2014). A proteína RBP (RNA-Binding protein) está ligada à supressão de silenciamento gênico e patogênese viral (Deng *et al.*, 2015).

O critério de demarcação de espécies no gênero baseado no genoma apresenta o valor de cerca de 72% de identidade de nucleotídeos ou 80% de identidade de aminoácidos entre seus respectivos genes CP ou Rep como limiar para dois isolados serem considerados como da mesma espécie. Entre vírus de diferentes gêneros, o valor é de cerca de 45% de identidade nucleotídica nesses genes da CP e Rep (ICTV, 2022). O gênero *Carlavirus* apresenta o maior número de espécies da família *Betaflexiviridae*. O nome do gênero é derivado da espécie-tipo *Carnation latent virus*, que causa em plantas de cravo sintomas leves ou infecção assintomática, sendo comumente encontrado em coinfeção (SHAW *et al.*, 2008).

Existem muitas espécies importantes no gênero como o *Cowpea mild mottle virus*, sendo relatado pela primeira vez em feijão caupi (*Vigna unguiculata*) e depois em vários continentes

como África, Ásia e América do Sul. Muitas plantas cultivadas da família Solanaceae e Fabaceae são infectadas por isolados de *Cowpea mild mottle virus* (TAVASOLI; SHAHRAEEN; GHORBANI, 2009).

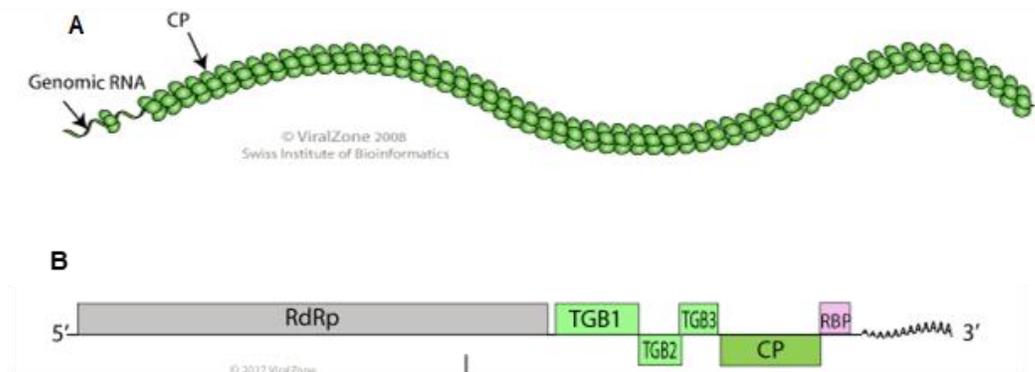


Figura 1. Representação gráfica das características de partícula e genoma do gênero *Carlavirus*. A. genoma viral encapsidado. B. representação da organização genômica dos membros do gênero *Carlavirus*. RdRp (RNA polimerase dependente de RNA; neste trabalho descrito como Rep); TGB1, TGB2 e TGB3 (‘triple block gene’); CP (capa proteica). RBP (‘RNA binding protein’) (CARLAVIRUS ~ VIRALZONE, 2021).

1.4 *Potato Virus P*

O *Potato virus P* foi descrito no Brasil no ano 1993 (DANIELS *et al.*, 1993) e na Argentina a mesma espécie foi descrita como Potato rough dwarf virus no ano de 1996 (BUTZONITCH *et al.*, 1996). Não houve relatos em outros países da América do Sul ou em outros continentes até 2019, quando houve o registro e identificação de um novo isolado de PVP na Rússia (YANAGISAWA *et al.*, 2019).

Há três acessos no GenBank correspondentes ao genoma completo de PVP, o isolado brasileiro (EU338239), o isolado da Argentina (EU020009) e isolado da Rússia (LC480818) (NATIONAL OF LIBRARY MEDICINE, 2022). As principais hospedeiras são pertencentes às famílias Solanaceae e Amaranthaceae e quando infectadas apresentam infecções assintomáticas, em grande parte dos casos, ou sintomas como nanismo, clorose e manchas com halos avermelhados (MASSA *et al.*, 2006; NISBET *et al.*, 2006).

A diagnose pode ser feita de forma sorológica com o uso de anticorpo monoclonal ou policlonal (NISBET *et al.*, 2006). Trabalhos de caracterização biológica e molecular corroboraram o agrupamento destes vírus PVP e potato rough dwarf vírus dentro da mesma espécie não como espécies diferentes como descrito anteriormente (MASSA *et al.*, 2008; NISBET *et al.*, 2006).

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Processamento da amostra e sequenciamento

Para realização do trabalho, folhas de plantas distintas de tomateiro apresentando sintomas de necrose, principalmente nas folhas medianas foram coletadas em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, no ano de 2014. A amostra foi nomeada de ‘RNY1’ e os procedimentos prévios ao sequenciamento foram realizados pela equipe do Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças, sob os cuidados e organização da Dr. Camila Morais Rêgo-Machado, durante seu período de mestrado (RÊGO *et al.*, 2017). A seguir as principais etapas serão descritas:

As folhas congeladas foram submetidas a um processo de semi-purificação para enriquecimento de partículas virais como descrito por BLAWID *et al.* (2017) com algumas modificações. Aproximadamente 30 g de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 350 mL de 0,1 M tampão fosfato, 0,001 M EDTA, 0,2% β -mercaptoetanol, pH 8. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 3.900 g por 20 min. O sobrenadante foi centrifugado sobre solução de colchão de 20% sacarose a 33.000 rpm (rotor Ti-45, Beckman Coulter – Califórnia, EUA) por 2 h para precipitação das partículas. O precipitado foi usado para extração de RNA usando o RNeasy Minikit (Qiagen – Hilden, Alemanha). O sequenciamento foi realizado na empresa MacroGen Inc.® (Coréia do Sul), na plataforma *Illumina* HiSeq2000 após construção de biblioteca com *Illumina* TruSeq RNA library kit.

2.2 Montagem de HTS

A montagem dos genomas foi feita a partir do agrupamento dos '*reads*'. Inicialmente, os adaptadores e leituras com baixa qualidade foram eliminadas utilizando o BBDuk, ferramenta do software Geneious® (KEARSE *et al.*, 2012). A montagem dos '*contigs*' gerados foi feita pelo programa MEGAHIT® (LI *et al.*, 2015).

A relação taxonômica dos '*contigs*' foi investigada contra o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando a ferramenta DIAMOND para análise de BLASTx (Basic Tool Alignment Search Tool) (BUCHFINK *et al.*, 2015). Os '*reads*' foram mapeados contra os '*contigs*' virais com o software BBDuk® para estimar a abundância relativa de cada vírus na amostra. Os valores TPM (*transcripts per million*) foram calculados usando o pacote R. O valor de TPM indica quantas moléculas de RNA foram sequenciadas a cada milhão de moléculas sequenciadas.

Os valores de identidade aos pares foram calculados com o software SDT.v.1.1.2® (MUHIRE *et al.*, 2014) usando as sequências de aminoácidos da Rep e CP de todos os isolados de PVP e todos os carlavírus que possuem as duas proteínas completamente sequenciadas.

2.3 Análises filogenéticas

Árvores filogenéticas da Rep e CP foram montadas para cada proteína a partir de alinhamentos em aminoácidos feitos com o programa MAFFT (*Multiple sequence Alignment based on the Fast Fourier Transform*) (KATOHI *et al.*, 2002). As árvores foram montadas com o programa IQ-Tree usando o modelo de substituição inferido pelo ModelFinder (KALYAANAMOORTHY *et al.*, 2017) onde os valores de suporte de cada ramo foram estimados pelo método SH-aLRT (MINH *et al.*, 2013).

2.4 Análise de recombinação

Análises de recombinação foram feitas com alinhamento MUSCLE (realizado no programa MEGA11 (TAMURA *et al.*, 2021) do genoma completo dos três isolados de PVP e todas as sequências-referência dos carlavírus disponíveis no GenBank com o programa RDP4 (MARTIN *et al.*, 2015). Eventos de recombinação suportados por pelo menos 5 métodos (p ajustado pelo método Bonferroni $< 0,05$) foram considerados significantes. Adicionalmente, foi feita uma análise de distância entre as sequências de PVP (“distance plot”) pelo RDP4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de HTS

A partir do sequenciamento, 4.046.890 pares de 'reads' foram gerados, dos quais 4.039.511 foram retidos após controle de qualidade dos dados. Dois 'contigs' principais foram gerados, de 3697 e 4986 nt mostraram semelhança com PVP (acesso LC480818) em buscas com o programa Diamond BLASTX contra o banco de dados (E -value = 0; identidade = 74,4 e 92,9%, respectivamente). Adicionalmente, foram encontrados 'contigs' relacionados a potato leafroll virus (PLRV) e potato virus Y (PVY), assim como poucos 'contigs' relacionados a outros vírus possivelmente associados a bactérias, artrópodes ou fungos. Os principais vírus detectados foram o PLRV, PVY e PVP, portanto, a abundância relativa desses vírus foi estimada nos 'reads'.

Foi observado que o PVP foi o vírus de planta mais abundante no sequenciamento da amostra (**Figura 2**). Isso indica que o vírus PVP pode ter uma importância alta na região. Esse resultado, no entanto, precisa ser analisado com cautela, já que o método de purificação de partículas pode influenciar na seleção de partículas virais mais estáveis. Uma única abordagem de purificação de partículas virais não é capaz de abranger um grande número de espécies virais de forma igual, dificultando sua quantificação de forma correta (ROOSSINCK *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015). Importante também ressaltar que um dos vírus com maior abundância, o PLRV, é restrito ao

floema o que também pode ser um atenuante no processo de purificação e extração de RNA (HIPPER *et al.*, 2013).

O foco dessa dissertação é a caracterização do genoma de PVP, sendo que os demais vírus serão descritos em outra oportunidade.

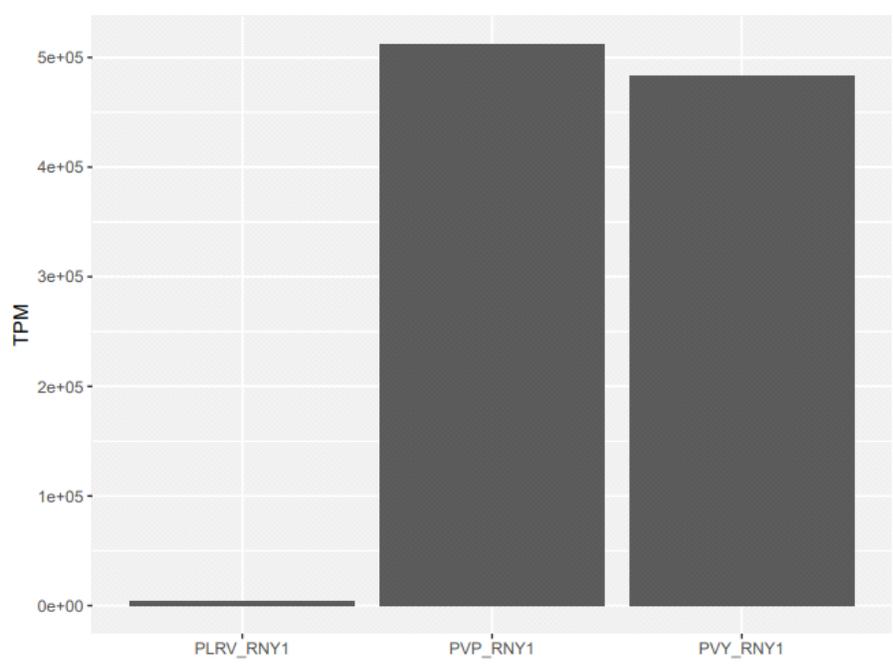


FIGURA 2. Abundância relativa de transcritos por milhão (TPM) dos três principais vírus encontrados na biblioteca RNY-1

O '*contig*' de PVP foi remontado com a função *de novo* 'Assembly' do programa *Geneious* R8®, resultando em uma sequência consenso de PVP de 9554 nt. A integridade das extremidades 5' e 3' dos '*contigs*' foi averiguada através de alinhamentos com outros genomas completos de PVP, onde porções quiméricas foram removidas, resultando em uma sequência consenso final de PVP de 8335 nt (**Anexo I**). O isolado foi nomeado PVP_RNY-1. As ORFs do genoma quase completo do PVP foram preditas com a função Find ORFs do *Geneious* R8 (**Figura 3**), que confirmou que todas as ORFs conhecidas foram inteiramente sequenciadas: a ORF1 identificada a partir da posição 47 até a posição 5845 somando um total de 5799 bases nitrogenadas e 1932

aminoácidos, ORF correspondente à Rep; a ORF 2 corresponde ao gene TGB1 que inicia na posição 5876 até 6565 somando um total de 690 bases nitrogenadas e 229 aminoácidos; a ORF3 corresponde ao gene TGB2, na posição 6543 até 6863 somando um total de 321 bases nitrogenadas e 106 aminoácidos; a ORF4 que corresponde ao gene TGB3, se iniciando na posição 6845 até 7039, no qual somando um total de 195 bases nitrogenadas e 64 aminoácidos; a ORF5, corresponde ao gene da CP na posição 6535 até 7983, somando um total de 1449 bases nitrogenadas e 482 aminoácidos; e a ORF 6 corresponde ao gene RBP, se iniciando na posição 7976 até 8293 somando um total de 318 bases nitrogenadas e 105 aminoácidos (**Figura 3**).

O PVP foi relatado no Brasil (DANIELS *et al.*, 1993) e Argentina (BUTZONITCH *et al.*, 1996) na década de 90. O isolado da Argentina foi originalmente nomeado como potato rough dwarf virus (PRDV). A partir de análises sorológicas, biológicas e moleculares, concluiu-se que esses isolados pertencem à mesma espécie, atribuindo o nome *Potato virus P* por ter sido o primeiro vírus a ser descrito (MASSA *et al.*, 2008; NISBET *et al.*, 2006). Recentemente, um novo isolado de PVP foi identificado e dessa vez fora da América do Sul, na Rússia, e também em batata (YANAGISAWA *et al.*, 2019). Ao alinhar os genomas desses quatro isolados, verificou-se que a ORF da CP se inicia dentro da ORF TGB1 nos isolados RNY-PVP e da Rússia. Isso contrastou com a organização genômica dos isolados anteriormente descritos no Brasil e Argentina (**Figura 3**).

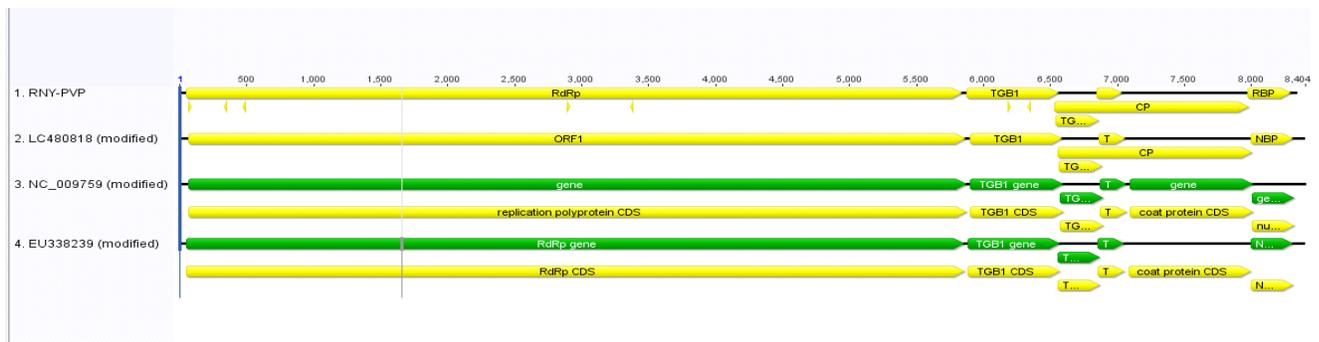


Figura 3. Identificação das ORF's e comparação com genomas de isolados de PVP: RNY-PVP (isolado de tomateiro); LC480818 (isolado da Rússia); NC_009759 (isolado da Argentina); e EU338239 (isolado brasileiro de batata).

3.2 Comparação das sequências

O genoma de PVP_RNY-1 possui uma maior identidade com o PVP da Rússia, do que em relação aos isolados da Argentina e do Brasil de batata. As sequências de aminoácidos dos genes da Rep e da CP são importantes critérios taxonômicos, portanto, foram avaliados separadamente. O PVP_RNY-1 apresentou na região da proteína Rep a identidade de aminoácidos de 97,1% (**Figura 4**) e na região da CP de 98,1% (**Figura 5**) com o isolado da Rússia (Tabela 2). Já para os isolados do Brasil e Argentina, a identidade foi de 81,7% e 81,2% para a Rep e 91,5% e 91,0% para a CP, respectivamente (**Figuras 4, 5; Tabela 2**).

Isso indica que o PVP_RNY-1 é mais próximo ao isolado da Rússia do que os isolados anteriormente encontrados na América do Sul. A identidade na região da CP foi maior que na região da Rep (**Tabela 2**).

Em relação a outros carlavírus, o vírus mais próximo foi o potato virus *S*, com identidade de aminoácidos de 72,0% na Rep e 50,2% na CP (**Tabela 2; Figura 4, 5**), confirmando que os isolados de PVP devem ser classificados como um carlavírus.

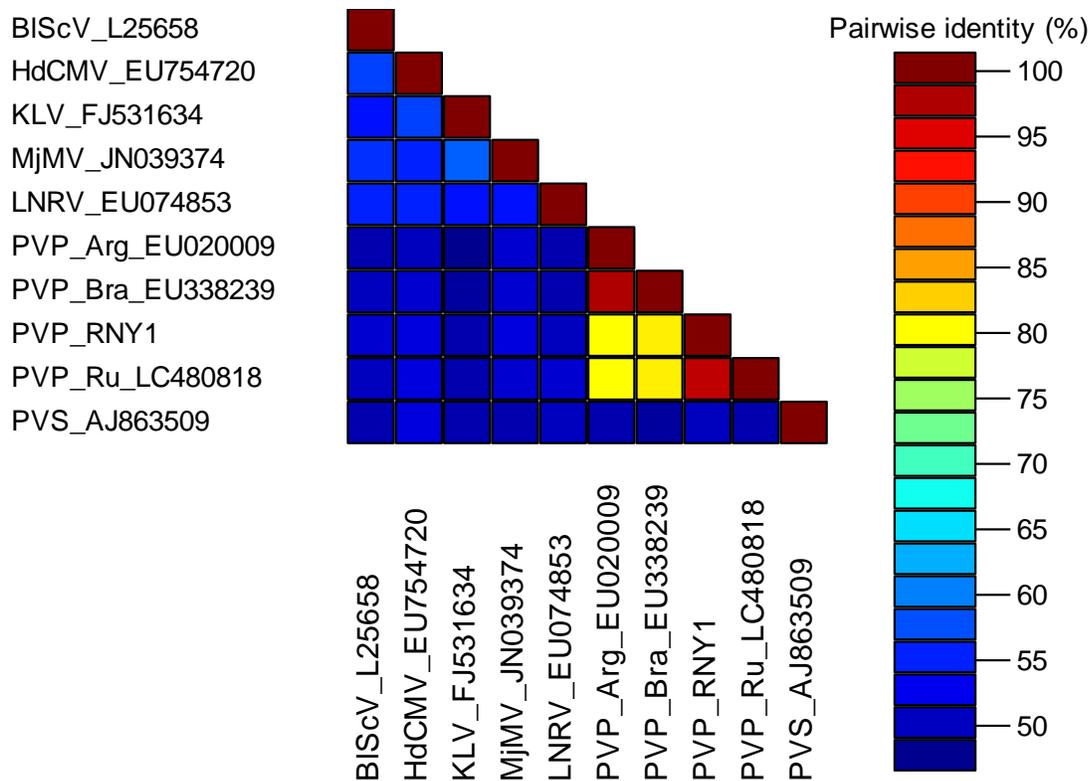


Figura 4. Comparação entre seqüências de amino ácidos da Rep de isolados de PVP e outros carlavírus mais próximos mostrados em matriz bidimensional de cores de identidade usando SDT. Acrônimos: BScV: *Blueberry scorch virus*; HdCMV: *Hydrangea chlorotic mottle virus*; KLV: *Kalanchoe latente virus*; MjMV: *Mirabilis jalapa mottle virus*; LNRV: *Ligustrum necrotic ringspot virus*; PVS: *Potato virus S*; PVP_Arg: PVP isolado da Argentina; PVP_Bra: PVP isolado do Brasil; PVP_Ru: PVP isolado da Rússia.

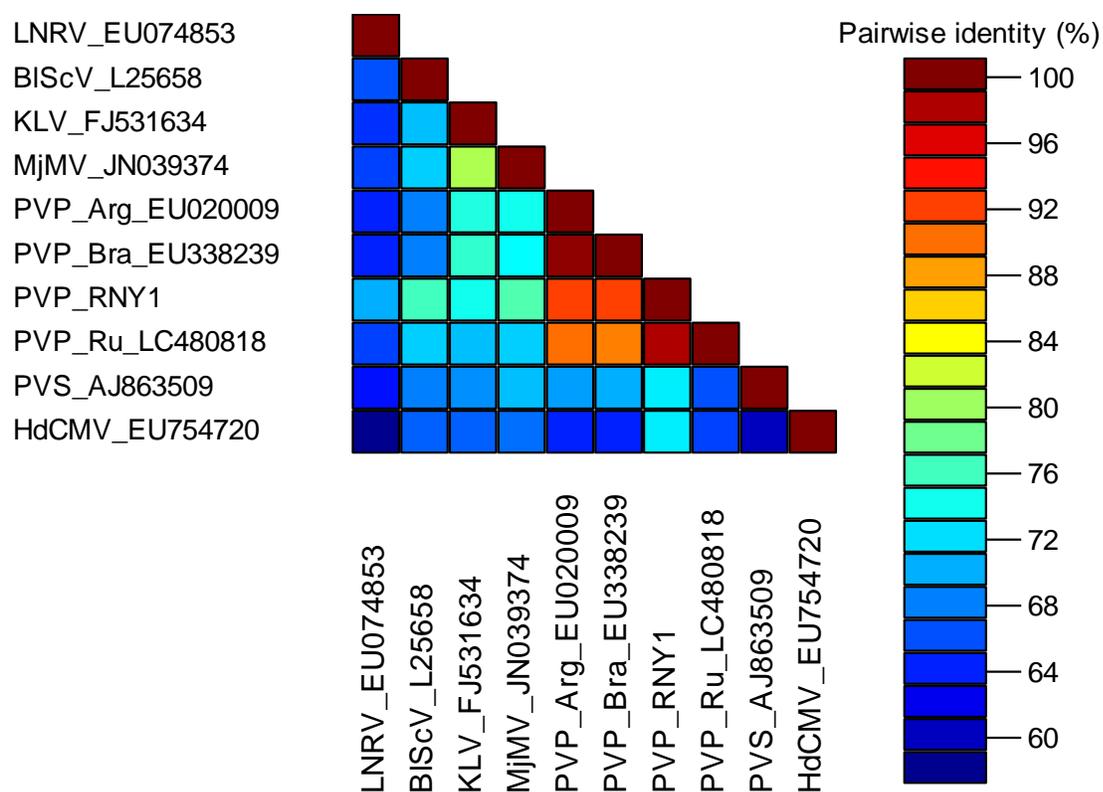


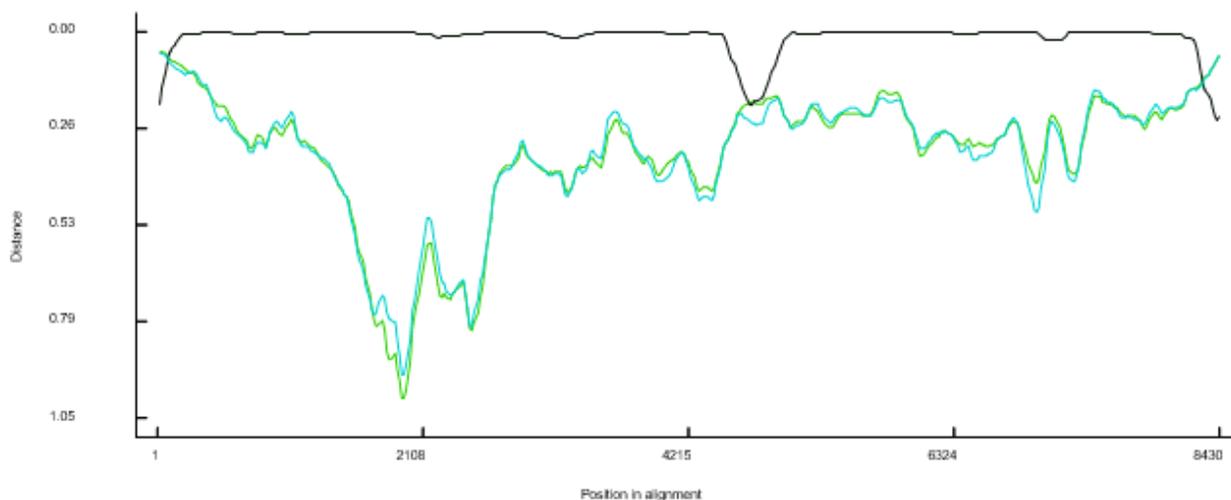
Figura 5. Comparação entre seqüências de aminoácidos da CP de isolados de PVP e carlavírus mais próximos mostrados em matriz bidimensional de cores de identidade usando SDT. BIScV: *Blueberry scorch virus*; HdCMV: *Hydrangea chlorotic mottle virus*; KLV: *Kalanchoe latente virus*; MjMV: *Mirabilis jalapa mottle virus*; LNRV: *Ligustrum necrotic ringspot virus*; PVS: *Potato virus S*; PVP_Arg: PVP isolado da Argentina; PVP_Bra: PVP isolado do Brasil; PVP_Ru: PVP isolado da Rússia.

Tabela 2. Tamanho e comparação de sequências de aminoácidos entre PVY_RNY-1 e isolados de potato virus P e carlavírus mais próximos das proteínas Rep e CP

Identificação	Acesso	Tamanho(nt)	% identidade proteica	
			Rep	CP
PVP – Rússia	LC480818	8394	97,1	98,1
PVP – Brasil	EU338239	8392	81,7	91,5
PVP – Argentina	EU020009	8404	81,2	91,0
Potato virus S	AJ863509	8478	50,2	72,0
Blueberry scorch virus	L25658	8517	51,2	76,8
Mirabilis jalapa mottle virus	JN039374	8315	51,6	76,4
Ligustrum necrotic ringspot virus	EU074853	8412	51,5	70,1
Hydrangea chlorotic mottle virus	EU754720	8433	51,8	71,8
Kalanchoe latente virus	FJ531634	8517	49,7	73,8

3.3 Análise de recombinação

Uma análise de recombinação foi feita com alinhamentos do genoma completo de todos os carlavírus (**Tabela 3**) com o programa RDP4. Nenhum evento de recombinação suportados por pelo menos 4 métodos (p ajustado pelo método Bonferroni $< 0,05$) foi detectado. Em adição a esta análise, foi feita uma comparação de distância (“distance plot”) pelo programa RDP4 e verificou-se que a sequência de nucleotídeos de PVP-RNY-1 apresenta alta identidade com a sequência do PVP da Rússia ao longo do genoma, exceto por uma região mais próxima da região final da Rep (**Figura 6**). Por outro lado, a divergência entre a sequência de PVP_RNY-1 com os isolados do Brasil e Argentina é alta, principalmente na parte central da Rep, explicando a baixa identidade descrita anteriormente (**Tabela 2**).



EU20009_PVP Argentina comparado com:

- EU338239_PVP_Brasil
- RNY-PVP
- LC480818_PVP_Rússia

Figura 6. Comparação da distância entre seqüências dos genomas completos de potato virus P. Distance plot implementado em RDP4.

3.4 Análise filogenética

Duas árvores filogenéticas foram construídas, uma com a seqüência de aminoácidos da CP (**Figura 7**) e outra da Rep (**Figura 8**) para os isolados de PVP e dos carlavírus (**Tabela 3**). Em ambas as árvores, o PVP_RNY-1 agrupou-se fortemente com o isolado da Rússia e com os demais isolados de PVP em um ramo distinto e separado dos demais.

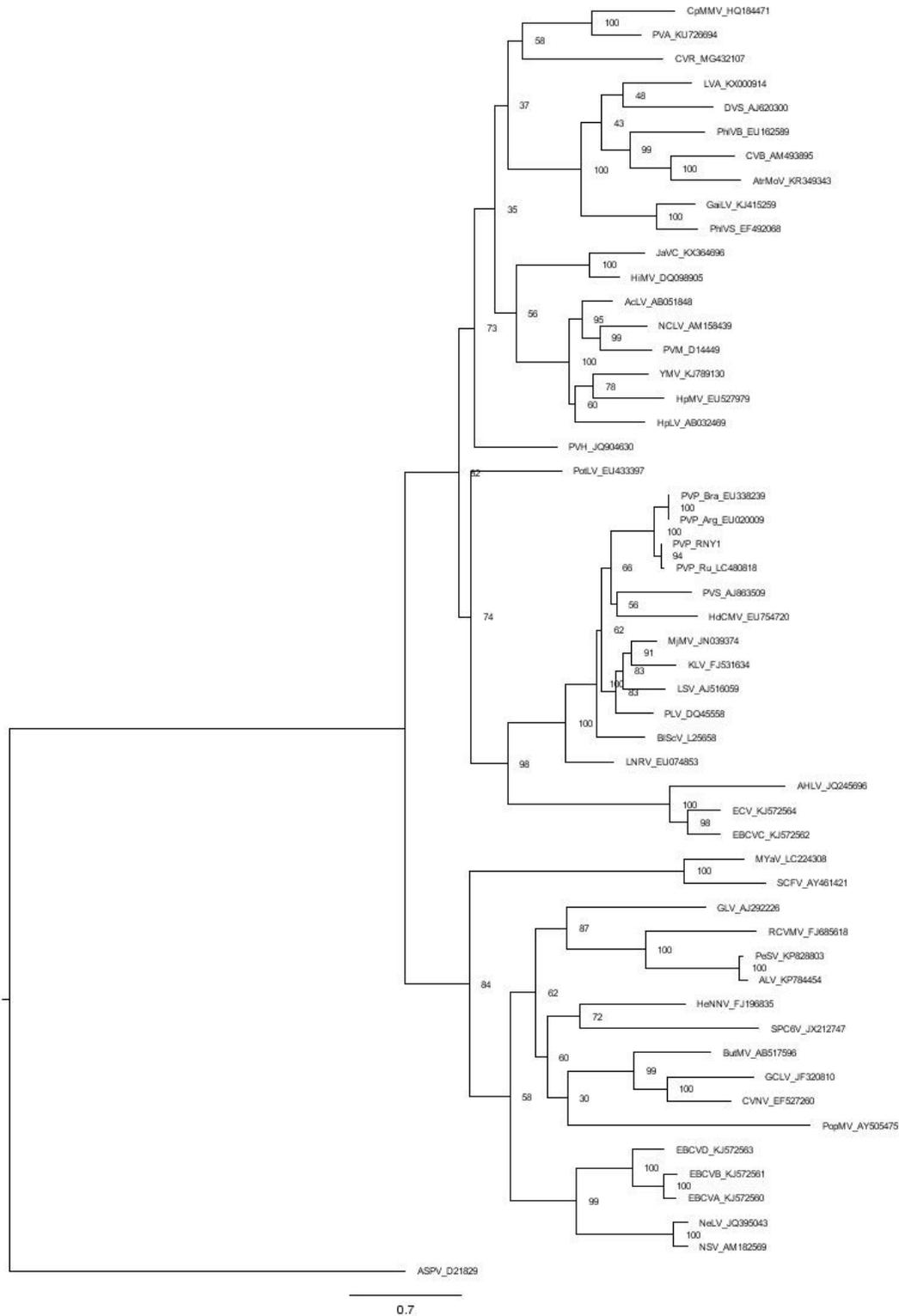


Figura 7. Árvore filogenética das sequências da CP dos isolados de PVP e dos outros carlavírus. Árvore de máxima verossimilhança montada com o programa IQ-Tree usando o modelo de substituição inferido pelo ModelFinder, onde os valores de suporte de cada ramo foram estimados pelo método SH-aLRT. Nome completo dos vírus na **tabela 3**.

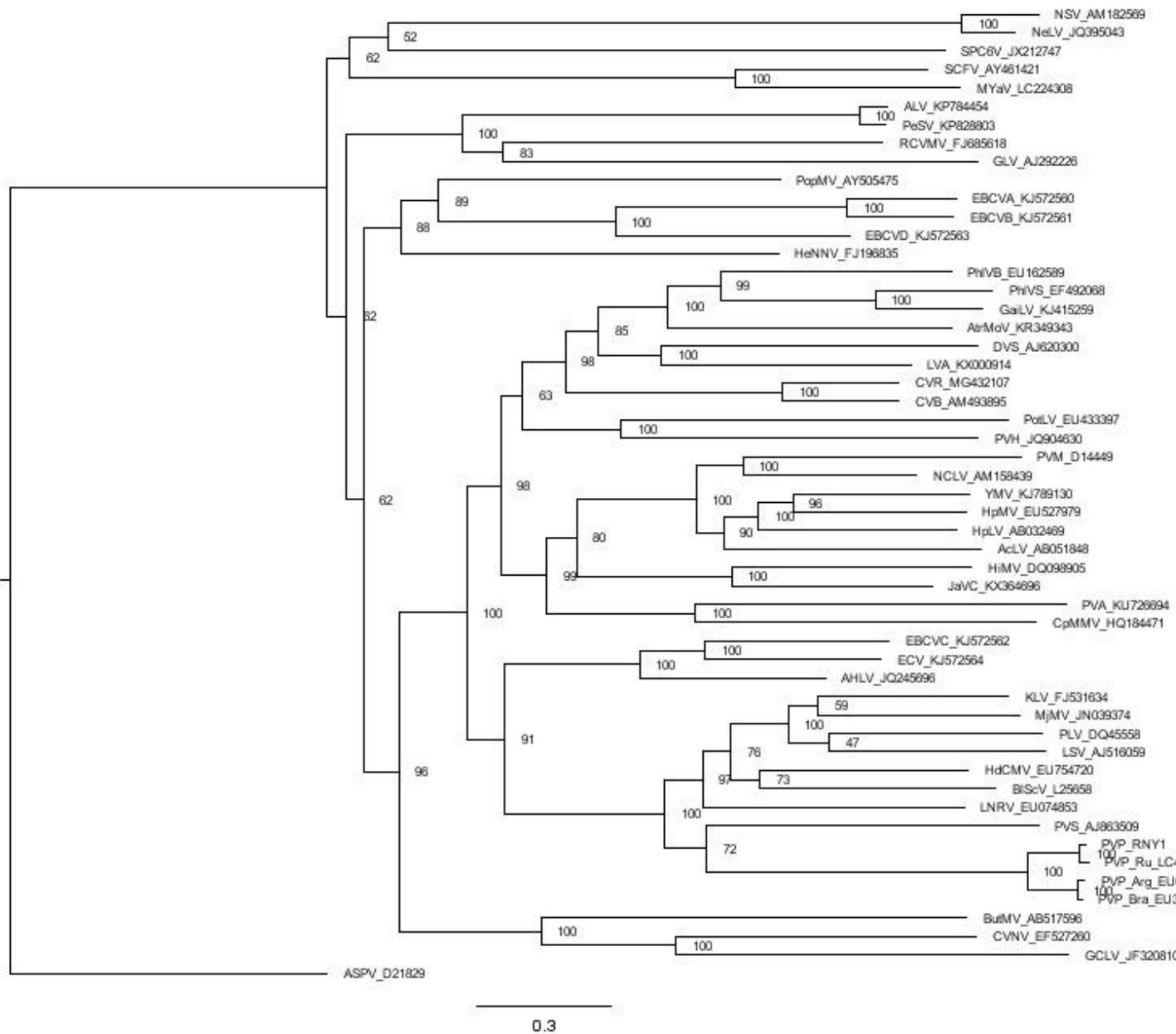


Figura 8. Árvores filogenética das sequencias da Rep dos isolados de PVP e dos outros carlavírus. Árvore máxima verossimilhança montada com o programa IQ-Tree usando o modelo de substituição inferido pelo ModelFinder, onde os valores de suporte de cada ramo foram estimados pelo método SH-aLRT. Nome completo dos vírus na **tabela 3**

Tabela 3. Acessos do banco de dados das sequências utilizadas para a análise filogenética dos carlavírus.

	Espécies	Número de acesso (GenBank)
1	<i>Nerine latent virus</i>	JQ395043
2	<i>Narcissus symptomless virus</i>	AM182569
3	<i>Elderberry carlavirus D</i>	KJ572563
4	<i>Elderberry carlavirus B</i>	KJ572561
5	<i>Elderberry carlavirus A</i>	KJ572560
6	<i>Garlic latent virus</i>	AJ292226
7	<i>Helleborus net necrosis virus</i>	FJ196835
8	<i>Sweet potato virus C-6</i>	JX212747
9	<i>Butterbur mosaic virus</i>	AB517596
10	<i>Coleus vein necrosis virus</i>	EF527260
11	<i>Garlic common latent virus</i>	JF320810
12	<i>Red clover vein mosaic virus</i>	FJ685618
13	<i>Pea streak virus</i>	KP828803
14	<i>Alfalfa latent virus</i>	KP784454
15	<i>Cowpea mild mottle virus</i>	HQ184471
16	<i>Pepper virus A</i>	KU726694
17	<i>Jasmine virus C</i>	KX364696
18	<i>Hippeastrum latent virus</i>	DQ098905
19	<i>Aconitum latent virus</i>	AB051848
20	<i>Narcissus common latent virus</i>	AM158439
21	<i>Potato virus M</i>	D14449
22	<i>Yam latent virus</i>	KJ789130
23	<i>Hop latent virus</i>	AB032469
24	<i>Hop mosaic virus</i>	EU527979
25	<i>Potato virus H</i>	JQ904630
26	<i>Potato latent virus</i>	EU433397
27	<i>Potato Virus P_Bra</i>	EU338239
28	<i>Potato Virus P_Arg</i>	EU020009
29	<i>PVP -RNY-1</i>	
30	<i>Potato virus P_Ru</i>	LC480818
31	<i>Mirabilis jalapa mottle virus</i>	JN039374
32	<i>Kalanchoe latent virus</i>	FJ531634
33	<i>Passiflora latent virus</i>	DQ455582
34	<i>Lily symptomless virus</i>	AJ516059
35	<i>Blueberry scorch virus</i>	L25658
36	<i>Potato virus S</i>	AJ863509
37	<i>Ligustrum necrotic ringspot virus</i>	EU074853

38	<i>Hydrangea chlorotic mottle virus</i>	EU754720
39	<i>Ligustrum virus A</i>	KX000914
40	<i>Daphne virus S</i>	AJ620300
41	<i>Phlox virus B</i>	EU162589
42	<i>Chrysanthemum virus B</i>	AM493895
43	<i>Atractylodes mottle virus</i>	KR349343
44	<i>Gaillardia latent virus</i>	KJ415259
45	<i>Phlox virus S</i>	EF492068
46	<i>Chrysanthemum virus R</i>	MG432107
47	<i>American hop latent virus</i>	JQ245696
48	<i>Elderberry carlavirus E</i>	KJ572564
49	<i>Elderberry carlavirus C</i>	KJ572562
50	<i>Melon yellowing-associated virus</i>	LC224308
51	<i>Sweet potato chlorotic fleck virus</i>	AY461421
52	<i>Poplar mosaic virus</i>	AY505475
53	<i>Apple stem pitting virus</i>	D21829

Este é o primeiro relato de um carlavírus em tomateiro no Brasil e PVP em tomateiro no mundo. Há relatos de carlavírus em tomateiro em outros países, por exemplo as espécies *Potato virus S* e *Potato virus M* entre 2016 e 2017 na Índia (CHAUDHARY *et al.*, 2018) e também um isolado de *Potato virus M* em 1997 na Itália (GRIECO *et al.*, 1997). O *Potato virus S* também foi relatado em tomateiro na Eslováquia (PREDAJŇA *et al.*, 2017). Com sintomas aparentes foi identificado *Pepper virus A* em tomateiro na Índia (KARNAWAR *et al.*, 2019).

Detalhes da infecção causada por PVP não são conhecidos e, por isso, se faz necessário trabalhos adicionais que possam aprofundar os estudos de epidemiologia deste patógeno aqui descrito. Outros trabalhos com PVP do Brasil e Argentina relatam que após inoculação mecânica em tomateiro, o PVP do Brasil foi capaz de infectar a cultivar de tomateiro MoneyMaker, mas sem a descrição de sintomas (NISBET *et al.*, 2006). Hoje, o isolado descrito de PVP da Argentina, que fora nomeado de Potato rough dwarf virus, é classificado

como pertencente à espécie *Potato virus P* levando-se em conta a caracterização molecular assim como também a gama de hospedeiro (MASSA *et al.*, 2006; NISBET *et al.*, 2006). No Brasil se tem apenas relato de PVP no estado do Rio Grande do Sul, o maior produtor de batata do Brasil com 117263 hectares (ha). Os outros dois maiores produtores são Minas Gerais com 35665 hectares e Paraná com 27160 hectares (IBGE | BRASIL | PESQUISA | PRODUÇÃO AGRÍCOLA - | BATATA-INGLESA, 2020). É difícil saber ao certo qual é o centro de origem do patógeno, já que há uma intensa movimentação de batata-semente entre os países e pelo Brasil ser um importador, de acordo com Associação Brasileira da Batata (2022). Considerando que a infecção por PVP pode ser, na maioria das vezes, assintomática, é possível que a doença seja distribuída mais amplamente no mundo.

Os vírus detectados em batateira, no Brasil e na Argentina, são mais próximos entre si do que com o PVP de tomateiro. Este possui uma proximidade maior com o PVP descrito na Rússia (YANAGISAWA *et al.*, 2019). Não se sabe se o PVP da Rússia deu origem ao PVP de tomateiro do Brasil ou vice-versa. Trabalhos podem ser desenvolvidos aqui no Brasil para avaliar se ainda são observados isolados de PVP descritos na década de 90, tanto em batateira como em tomateiro, além de outras potenciais hospedeiras

O isolado descrito na Rússia não foi caracterizado biologicamente. Assim, não há como fazer uma comparação com os isolados descritos anteriormente em batateira. Outro ponto a considerar é o tamanho maior da capa proteica, observado nos isolados de tomateiro e da Rússia. Isso mostra que estudos detalhados são necessários para um maior entendimento deste isolado em tomateiro. Este é o primeiro relato de PVP em tomateiro e são necessários mais estudos para uma caracterização melhor desta doença, que pode estar causando danos ainda não reconhecidos pelos produtores.

CONCLUSÃO

O isolado descrito pertence à espécie *Potato virus P*, sendo a primeira descrição em tomateiro, o isolado descrito neste trabalho é mais próximo geneticamente do isolado descrito na Rússia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGOUNOUX, Véronique. The history of tomato domestication to biopharming. [S. l.]: Biotechnology advances, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>
- BLAWID, R.; SILVA, J. M.F.; NAGATA, T. Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline. **Annals of Applied Biology**, v. 170, n. 3, p. 301–314, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/aab.12345>
- BUCHFINK, Benjamin; XIE, Chao; HUSON, Daniel H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. [s. l.], v. 12, n. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- CHAUDHARY, Poonam; KUMAR, Surender ; SINGH, Balwinder; HALLAN, Vipin; NAHPAL, Avinash. Kaur. Infection of potato virus S and M in tomato in North-western India. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 2, p. 343, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0057-3>
- DENG, Xing-Guang; PENG, Xing-Ji ; ZHU, Feng ; CHEN, Ying-Juan ; ZHU, Tong ; QIN, Shao-Bo ; XI, De-Hui ; LIN, Hong-Hui .A critical domain of Sweet potato chlorotic fleck virus nucleotide-binding protein (NaBp) for RNA silencing suppression, nuclear localization and viral pathogenesis. **MOLECULAR PLANT PATHOLOGY**. v.16.n.4. p. 365–375, 2015.
- FAOSTAT. [S. l.], 2021. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 15 jul. 2022.
- GRIECO, F; FRANCO, DI. GALLITELLI. D. POTATO VIRUS M IN TOMATO CROPS IN SOUTHERN ITALY. **Springer**, v. 79, n. 1, p. 45–49, 1997. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/41997866>

HAMMOND, John; REINSEL, Michael; GRINSTEAD, Samuel; LOCKHART, Ben; JORDAN, Ramon; MOLLOV, Dimitre. A Mixed Infection of Helenium Virus S With Two Distinct Isolates of Butterbur Mosaic Virus, One of Which Has a Major Deletion in an Essential Gene. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. December, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612936>

HIPPER, Clémence; BRAULT, Véronique; ZIEGLER-GRAFF, Véronique REVERS, Frédéric Revers. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. MAY, p. 1–24, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>.

HULL., Roger. *Plant Virology*. 5. ed. [S. l.: s. n.], 2014.

IBGE | CIDADES@ | BRASIL | PESQUISA | PRODUÇÃO AGRÍCOLA - | BATATA-INGLESA:[s. n.],2020. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/14/0?indicador=10242&tipo=grafico&localidade2=32>. Acesso em: 14 jul. 2022.

IMPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE SEMENTES DE BATATA - ABBA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.abbabatatabrasileira.com.br/materias-das-revistas/importacoes-brasileiras-de-sementes-de-batata/>. Acesso em: 14 jul. 2022.

KALYAANAMOORTHY, Subha; MINH, Bui. Quang; WONG, Thomas. K. F; HAESELER, Arndt. von; JERMIIN, Lars. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. V.14, p.587–589, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.4285#Bib1>

KARNAWAR, R.B.; ZORE, G.B.; CHAR, B.R. First report of Pepper virus A naturally infecting tomato in India. *New Disease Reports*, v. 39, n. 1, p. 24–24, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.024>

KEARSE, Matthew; MOIR, Richard; WILSON, Amy; STONES-HAVAS, Steven; CHEUNG, Matthew; STURROCK, Shane; BUXTON, Simon; COOPER, Alex; MARKOWITZ, Sidney; DURAN, Chris; THIERER, Tobias; ASHTON, Bruce; MEINTJES, Peter; DRUMMOND,

Alexei. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

KONDO, Hideki; YOSHIDA, Naoto; FUJITA, Miki; MARUYAMA, Kazuyuki; HYODO, Kiwamu; HISANO, Hiroshi; TAMADA, Tetsuo; ANDIKA, Ida. Bagus; SUZURI, Nobuhiro. Identification of a Novel Quinvirus in the Family Betaflexiviridae That Infects Winter Wheat. **Frontiers in Microbiology**. v. 12, n. August, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.715545>

LI, Dinghua; LIU, Chi-Man; LUO, Ruibang; SADAKANE, Kunihiko; LAM, Tak-Wah. Sequence analysis MEGAHIT : an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>

LOPES, CARLOS ALBERTO. ÁVILA, Antônio Carlos de. Doenças do Tomateiro. [S EMBRAPA, 2021.

MARTIN, Darren P; MURREL, Ben; GOLDEN, Michael; KHOOSAL, Arjun; MUHIRE, Brejnev. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus evolution** v. 7, n. 1, p. 5–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ve/veaa087>

MASSA, Gabriela; SECRETIN, María Eugenia; COLAVITA, Monica; RIERO, María Fernanda. Biological and sequence data suggest that potato rough dwarf virus (PRDV) and potato virus P (PVP) are strains of the same species Annotated Sequence Report. **Arch Virol**, v. 151, p. 1243–1247, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0760-9>

MASSA, Gabriela; PORTANTIER, M; SECRETIN, María Eugenia; BRAVO-ALMOACID F.F; S. E; FEINGOLD, S. E. Comparison of complete sequences of potato rough dwarf virus and potato virus P and their relationships to other carlaviruses. *Archives of Virology*, [s. l.], v. 153, n. 9, p. 1787–1789, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0173->

Z

MINH, Bui. Quang; NGUYEN, Anh. Thi; HAELASELER, Arndt. Von. Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. **Molecular Biology and Evolution**, V. 30, N 5, março, 2013, p 1188–1195

MORENO, Ana Beatriz; LÓPEZ-MOYA, Juan José. When Viruses Play Team Sports: Mixed Infections in Plants. **Phytopathology Review**. Vol. 110, No. 1, p. 29-48, 2020.

MUHIRE, B M; VARSANI, A; MARTIN, D P. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 108-277, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>

NATIONAL OF LIBRARY MEDICINE. GenBank Overview. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 12 ago. 2021.

NISBET, C; BUTZONITCH, I; COLAVITA, M; DANIELS, J; MARTIN, R; BURNS, GEORGE, M; AKHOND, A. Y; MULHOLLAN, V. C; JEFFRIES, J. Characterization of Potato rough dwarf virus and Potato virus P: Distinct strains of the same viral species in the genus *Carlavirus*. **Plant Pathology**, v. 55, n. 6, p. 803–812, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2006.01448.X>

ONG, Sheue. Ni; TAHERI, Sima; OTHMAN, Rofina. Yasmin; TEO, Chee. How. Viral disease of tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.): an overview. **Journal of Plant Diseases and Protection**.v. 127, n. 6, p. 725–739, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00330-0>

PREDAJŇA, L; ŠOLTYS, K; KRAIC, J; MIHÁLIK, D; GLASA, D. FIRST REPORT OF POTATO VIRUS S INFECTING TOMATO IN SLOVAKIA. **Journal of Plant Pathology**. v. 99, n. 3, p. 811, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4454/JPP.V99I3.3948>. Acesso em: 13 jul. 2022.

RAJAN, Ashish; ICHIHASHI, Yasunori; SINHA, Neelima R. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. **Genome biology**.v.167.p 13:167, 2012.

RÊGO, C .M; NAKASU, E. Y. T; UENO, B; INOUE-NAGATA, A. K. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS FITOPATOGÊNICOS EM TOMATEIROS POR NEXT-GENERATION SEQUENCING. In.: 2017, UBERLÂNDIA- MG. 50 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2017, Uberlândia, MG. Anais do 50 Congresso Brasileiro de Fitopatologia. UBERLÂNDIA- MG: [s. n.], 2017. Disponível em:

http://www.infobibos.com/anais/CBFito/50/Resumos/Resumo50CBFito_0467.pdf.

Acesso em: 15 jul. 2022.

ROOSSINCK, Marilyn J; MARTIN, Darren P; ROUMAGNAC, Philippe. Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. **Phytopathology**. v. 105, n. 6, p. 716–727, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW>

RUBIO, Luis; GALIPIENSO, Luis; FERRIOL, Inmaculada. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. July, p. 1–23, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>

TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 1.2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

TAVASOLI, M; SHAHRAEEN, N; GHORBANI, S.H. Serological and RT-PCR detection of cowpea mild mottle carlavirus infecting soybean. *Journal of General and Molecular Virology*. v. 1, n. 1, p. 7–11, 2009. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/JGMV>

WEI, Zhongyan; MAO, Chenyang; JIANG, Chong; ZHANG, Hehong. Identification of a New Genetic Clade of Cowpea Mild Mottle Virus and Characterization of Its Interaction with Soybean Mosaic Virus in Co-Infected Soybean. **Frontiers in Microbiology**. v. 12, n. 650773, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.650773>

WU, Qingfa; DING, Shou-Wei; ZHANG, Yongjiang ; ZHU, Shuifang. Identification of Viruses and Viroids by Next-Generation Sequencing and Homology-Dependent and Homology-Independent Algorithms. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 53, p. 425–444, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120030>

YANAGISAWA, Hironobu; MATSUSHIRA, Yosuke; KHIUTTI, Aleksandr; MINNENKO, Nina; OHTO, Yasuo; AFANASENKO, Olga. Complete genome sequence of a divergent strain of potato virus P isolated from *Solanum tuberosum* in Russia. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 164, n. 11, p. 2891–2894, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04397-5>

Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2022.

ANEXO I

Genoma PVP-RNY

TATATCGTATAATAGATAACAAGAATCCATAATACGATATAATACCATGGCACTAAC
ATACAGGAGCCCTGTCTCGAGGAGGTGTTGGCTTTATTAGAACCTAGCTCGCAATCATT
GATAGCAGCTACAGCTACCCAAAATTTACAACAGAGTGAACAGGAGTTATACTCTT
GGTTTTGCTATAGTATGCCAGCGTTGGCTAAGGAGCACTTAAGTAAAGCAGGTATTT
ATTTAAGCCCTTATGCTGGATACCCGCACTCGCACCCCTGTTTGTAAAACCTTTGGAAA
ATTACTTGTTGTATAGTGTAGTGTCAAATTTAGTTAATCCTTCCTTTTACTTTGTGGG
AATTAAGGAAAGTAAGCTGAATTTTTTTGAAGAAACGTAGAAAGAACATGAGTACAG
TGACTGCCATTAATAGATATGTAAGTACTAGCGCAGATAAAAATTAGATATGGTAATGAAT
TCGTATATTACGCTTCAAATGAGATAAAAAGGCTTGAAAAGGCACAGAGAATTACTG
GATTCTGATTCATTGCGTGCTCTAGTGCCAAATGTGAAGGAAGGTTGCAACCTCTTC
TTCCATGATGAGTTGCATTATTGGTCCAAAGAGGACTTGAGCACATTTCTGGAGGTA
ATCAAGCCGAAGTGCGTACTGGCAACAATTGTGTTCCACCAGAACTCTTCCTTGGA
GCAAAACGCTCGCTCAATCCATGGTGCTACGAGTACGAAGTCTGTAATGGGAGATTC
AGTTTCTACCCAGATGGGGTGAGAGCTGAGGGCTACGAGCAGCCTCTGAATGGTGG
TTACTTGCTGAAGGCTAACTACATAGAGTTGCCCAATGGCGACGTATATAGCGTTGA
CGTTGTGTGCAGTAAGTTTGCGCATCATCTGGTGAGCCTGACAAGGGGCAAGTTAGT
CACACCACGGAGAAGGTCCCTTTGGTCCATTTGAAGCTATAGATAGTAAAGGTTTGCG
TAGTTTAGACAGTAAGAGTCAGGTTTTCTTTCCAGTAAATTTGAGTGTGTTTCTAGG
TTGTATAGGTATTTGCGGTCCCTGAAGAAACCAGATAAGCAATCCGCGATGGCTAAG
TTCTCACAATTGGTGCCTGAACCGTCCGGAGAGGCGATCAAGTTCGTGGAGGAATTC
AGTAGCCTTGTTATAGGGACTGACTCATTAAAGGACGGCCCTGTGTGCAGAAAAATTA
ACCGCCTTCTTCGGAAATTTGGGAGCAGCTATGCCCCCCGGAATAGCAAGCAAGATT
AGTTCGGCAAGGTCGGTGTGTCTCGATCAATTTGTGTTTTTCATTGAGGGCACTGACC
GTGGAGCTTGACTTGGTGAGCCTGAAGAAAGGTGTTAGCTTTTGTGAATGGGATATG
TTTTGCGCAGAGCCTGAAGAGCACGAGGTGGACATACTGAGTAGAATGGAAGGTCTG
TTGGGGTGGGATGAGCCTGGAGCGCATCCGCAGTCCGTACGTTGGTCTGCTAAGAAT
GAGCACGTACAGGCATGCGGTCTACATGGACTTCAACGTTCAAAGCTTCGCAAGTCTG
TGTCGTTGCACTCTTTCTGGATTGCTATGCCCCGACCTTTAGTGAAATTGGCCCACT
TTTCAAGAATACATTGATCTGCTGAAGGGTAGTTGCAATCTATTAGGATCACTCATG
TTGTCTTGCTTAGATTGCAAGATTTTGAATGGATGAAAGGCTGGGGCGGAGAGGCA
GCATTTGAAACAGGTGGTCTTTGCTTGGGACGGTGTTCATGGTTCTTCGGGGGGCG
ACGAAGGGCATAACGTTTCGGAAGCTCAAATCTAGTGATCAGTTGGAGTGGGAAACTG

AGTGGGATGCCCCAGTGCTAAGAGTTGTAGATGGTGTGCCCTTCTGCGACATCTTTT
CAAAGACCGCTGGAGAACAAGGCCACGCACCTGTATTTTTTGAGGGTATGTTTTAC
AGGATAGGCAAGTGGAGCCGCCCATAGCCATGGAGGTGAATGAGGTTGGGACTTTG
GGCTTTGGATGTTGCTTGGATCTCATCGTGCAAGGCCCCACAGCACAATCGGTGAA
CATGCTTTCATGGATGAGGTGTGCACCCGAGGAGTTGGCGCCGGGGTATGGTATACC
AAATGCAATGGGGCCGGCATGGAGATGTATGCTGACATGCAAGTGTGGCCGAAGTG
GTTGGATTTGTACCTCCAGTTGCACAACCTCTGACCCAGCGAGGTATGAGATGGCCTT
GGTCAAGTACTTTGCATCTGGGCAATTGGTTACCATACGGAGTGTTATGCAGAGCAA
GTGCAGTGAGAATGCAGGGATCGAGATCTTCATACTGAGTGGTGAGGTCTATTTAGT
ATCCAAATGCAGCTCGGAGGGATTATACACATTGAAAGCAGGGCATACTTTGAGGG
TGCGGAACCTCAGCGAGCATGAGATGGGAGTGGTGCCAACCAGCGAGTATTGTAGG
ATCCTGCTGTGTGGATCAAGAGGAGAAGAAGGTGTGGACCTAGATGGTAACAAGGG
ATTGATTATCCGCACAATGCCGCTCATTGGTGCTGAAATGGAGGGGACGGGAGTGA
CTGTCTCTCATGAGTTGAAGTGTACTATCGGGAAAGTACACAGGATCAGAAACCCTG
GTGGTGGTGACTGTTTTTGGCACGCATTGGGCTATTACACGGGCTTAAGCGTTCAAG
CAATGCGTTCAGTCTGAAGAGAGCGCAGCTCGGCACAGAGAAATACAGAGAGAAA
TTGGCAGAACAGTTGGACGCAAACAATTGGGCGCAGTGCGAGGCAATATCTGCGGC
TTGTGCACACTTTGGTTTGGATATACACATATATGATGCGAAGCAAGAGCACATCGT
CAGGTACTGCAAGGGCGGCAATGAAGGGAGTTGCATGCTTTGGTGTGAAGGTGAGC
ACTTTGAAGCTGTGGAAATGGTGGAGGCATGTGTGTTGAGAGCCATATCGGAATTGC
TGGGTAGGAAGTTGCAGGATGTGCAGAAAGTCGTGCACAACAACTTGGTGAGGAT
TTCGAAGCATGGCTCTTATCTGGAGAAGGCATCGAGAGTGGCAGACTCCCACAGGT
CTTTGAATGCTTCGACATCAAAGCATTGTGTATGATGGCGAAACAGCCCTTGTGAT
GAATGAAGGAGGAGCGACAACAGGCGTATTTGAGCTCAAAGATAGGCATCTGAATC
TGGTGCGGGGTGGACCTGAGGCGAAGCACGCCCTGACAAATACGAGGAATGAATCG
CTTGCCGTGGAACAAGCAAAGCTGAGAGATCTTTTCTCGATTAGCTCGCAGGTGCTC
TACAAGCCAGATGAGGGAAGAGGCAAATTATTGGCCAAGTGCTTAATTGAGGGTAA
CACCGGAGTACTGTGTTTCGTCACTATTCAATGGAGAAGGGAGCTTGTTCAGAGAA
TCCAAGTCACCGCGGAGTACAATTGAATTTCATACTAGGAGTCTTTGGGTGCGGCAA
GAGCACATTGTTTAAAAAGTTTTTAATTCAGGCTGCAGGGAAAAGTTTGGTGTACAT
CAGCCCAAGGAAAGCTCTGTGCCTTGACTTCACTAAATTGATTGGGGAGGTGAAAA
AGAAGAGGGGAGAAGGCAGCACGAAGTACTTCAGCTCCAGCACTTTTGAGACTGCG
CTGAAGAAGTCAGATAGGTACAGAGGCGGCAGTGTGATCATTTTGGACGAGATACA
ACTCTTTCCACCAGGGTATTTGGATCTTATGTTGCTTAGGTTGCAGGAGGAGTGCGTT
ATATTTTGTGTGGGGGACCCATGCCAGAGTGATTACGACAATGAGAGGGATAGATC
TACCCTCGGAGCTATACCAACCGATGTGATGCATGTGTTGAGAGATGCAGAGTACA
AGTACAATGTGCTTTCTCATAGATTCAAGAATGAGGACCTCACCGGGCGGCTACCTT
GTTTGTGAGATAGACGGTGTGATAAAGAAGCTCAGGTTGATCGAGGGCTTG
GACTGCATGGAGGAGCTGGAAGGAGTGAGGTCTGTGTGTTTAGTGAGCTCATTCGA
GGAGAAGAAAATTGTCGCTGGGTTCTTTGGCGCCGATTGCAAGTGCTACACCTTTGG

AGAATCAACCGGGCTTACTTTTCGATCGAGGTTGCATACTTCTGACAGCAGCATCTGC
AGCTGCAAGTGAAAGGAGGTGGGTCACCGCCCTTAGTTCGGTTTAGGGAAGAGATCG
TTCTGGTTAATGCTGGAACAGCTGCATGGCCCATCGTCCAGATGACATATGCCAAGA
GGGTGCTAGGGAGATTCTTGAGCAAGACTGCAAAGGTGGATGACCTGATCACCTC
TTACCTGGAAAGCCTGTCATCGTGGAGGGCTTTAGCATAGAGAAAATAGGAGCCGA
CGAGGGTAAGAGAGAAGACAAGCTGGCAGGAGATCCGTGGCTCAAAGTATGATC
AACCTATTTTCAGGTGGAGGATCAGGAGGAGGTTGAAGTTTGCAAGGAGGTACTGCA
GACCGAGTGGTTCAAACTCACCTACCCATATGTGAGATGGAGGGAGTGAGGTCCC
GATGGGTTCAAAAATACTGAGCAAGGAAGTGAGGGAGAAAAGAATGGGTTACCTT
GTTTCCGAACAATTCACAGATGAGCACTCGAGGCAGTTGGGGAAACAACCTACTAA
TGCGGCTGAGCGTTTTGAGACAATCTACCCAAGGCACAGGGCGGCAGACACTGTGA
CTTTCATCATGGCTGTGAGGAAGAGGCTTAGATTTTCAGACCCTGTGAGGGAGAACC
CAAAGCTAAAGATGGCCATGCCGTATGGGCCCTTCTGCTCAAGGAGTTCCTAAAGA
GAATACCACTGAAGCGGATGCATAATCAGGAAATGATGGCTAGTGCCTGCATGAT
TTCGAAGAGAAGAAGACCAGCAAGAGCGCGCAACTATAGAAAATCATAGTAATA
GGTCATGTAGGGATTGGCTGGCAGATGTCGGTATGGTGTCTCAAAGTCACAACCTAT
GCACCAAATTTGACAATCGATTCAGGGAAGCTAAAGCTGCACAGACCATAGTTTGT
TCCAACACTCTGTACTATGCAGATTTGCACCGTACATGAGGTACATTGAGAAGAAGT
TGCATGAGGTGCTTCCCAAGAAGTACTATGTGCACTCTGGCAAAGGCCTTGAAGAAT
TGAATGATTGGGTGCTTAGGTCCAAGTTTACTGGAGTGTGTACAGAGTCGGATTATG
AAGCTTTTGATGCAAGCCAAGACCAGTACATTGTAGCTTTCGAAATATGCCTCATGA
GGTACCTTGGGCTCCCAAATGATCTGATTGAGGATTACAAGTACATAAAGACACACC
TGGGGAGCAAACCTGGGCAATTTTGCAATTATGCGGTTTTCTGGTGAAGCAAGCACAT
TCCTATTCAACACAATGGCAAACATGCTATTCACCTTCTTGAGGTACGACCTCTCGA
GTAGTGCCTGCATTTGCTTTGCTGGTGTGATGATATGTGCAGCAATCAAATTTGAGGG
TGTCATGGAGCATGAGAAGTTTTTGGGGAAGTTGAAGTTGAAAGCTAAAGTCCAG
AAGACGACCAACCCACATTCTGCGGGTGGAGCTTGACAAAAGATGGGATTTTCAA
GAAACCCAGTTGGTCTATGAGAGGATGTGCATAGCCAAGGAGACAAATAACCTGC
ATAACTGTATTGACAACCTATGCCATTGAGGTGTCTTATGCGTACAAGCTTGGAGAGA
GAATCAAAGAATACATGGATGAGGAAGAGTTGGAAGCAATGTACAACCTGTGTGCGA
GTGATTGTGAAGAATAAGCATCTGCTGAAGTCTGATGTGATTTCCATCTTTAGTAGG
GGTTTGATAGAGTAGCTTAGGTTTTAGCTAGTAGTTTGATTATGTATGGATATTTTGA
TTAGAGTGTTATTAGAGTGTGGTTTTACTAGAATAAGGTCTGATCTTAGTTTGCCCAT
AGTTATACATAGTGTTCCCTGGCGCAGGCAAGTCCACAGTAATAAGGAAGGTGATTG
AGTCAGATCGGAGGTTCAAGGCGATAACTTTCGGGGAACCCGATCAAGTGAATCTC
TTGGGGTCGTACATACACAGTGCTGAGGTGGTGCCAGATTGTCAATTTCTGCTTGTT
GATGAGTACTTGAGTGGTAGGTGGATCGAGAGCGCATTTGCTGTTTTTCTGATCCG
TTGCAAGGAGGTGTAGGCGAGGTGAGGGAAGCTCATTTTATAAATAAGACCTCCAA
GAGATTTGGAAAGGCAACAGCGCAGCTGTTGAGGGATCTGGGATTCGACACCCAAG
CAGAAGCTGAGGACAGTGTGCAGATCTCTGACATCTTCAAAGTAGATCCAAGGGAT

CAAATAATCTTCTACGAGGAAGAGGTGGGTAGGCTGCTGAGAGCTCACGGCCTCGA
GTGCAGTTGTATTGAAGAGGTTAGGGGTAAAACCTTTGAAAGCGTCACCTTCGTGAC
TGGGGAGAATTCACCACCGAGCAAGGATAGGGCTAAAGTGTTTCAGGGGTAAACAA
GGCACAGGAAGAGCCTGTTGATCTTATGTCCAGATGCCTCTTACTCCGCCCTAAC
TACAGCCAGAGTGTGCTGTTTGCTGCAATTGGCATTTCATTGCTTTGTCAGTCGGGC
TGCTCACCAGGAGCACGCTTCCATTCGCAGGAGACAGCAGTCACTCACTACCCACG
GGGGCCTTTACAGGGACGGTACCAAGCATATACTATATAACCACCCGAAGAAGCTC
AACTCCGTGGAAGCAGGAAGTGCCTGGTGCAAGCAACCCTGGTACTCTGCATCAC
ACTCGTACTCCTTATTACATATCTCAGCAAAGGAGGAAATAGGTGCCAAGTATGCGG
CAGGCAACACTGAATTTGGTAGCTACGGCTGTTGGCATTGCTTTGGATGGCTGATC
CTCCAACAAATGCAAGGGGAAAGTTGCATGTTGAGAATAACAGGGGAGTCAATAAC
GTTGTCGAATTGCCCTTTGACTGTGGAAATTCTGAATGCAATAGCAACCATGAAACC
CTTGAGAGTGGACCTTTAGGTTTGCAGGCAGGGAGCCGATTAACAAACATGTCAACT
CCAGAAGAGAAACAGAGAGCTGAGGCAGCAGCAAGAGATGAAGCAATTAGAGCTG
AAACGGCCAGGAGGGAAGCGGATCGGAGAGGCAAAAGAATGGAGCAACCGGTGCC
CACACCAAGCAGTGGCAGTACCATTGCGGGGAATGAACAGAGCTTGCTTGAGAGTA
GGCTGGCCACCCTCATAGAGAAGCTAAACTCTGAGAGGCATAACTCTAATTTGCAG
AATGTGGCTTTTGAGATAGGAAGACCCGCTTTGGAGCCTGTACCAGAGATGCGTCGC
AATCCGGCAAATCCTTATGGGCGGTTCTCAATTGATGAGCTTTTCAAGATGAAGGTG
CGTGCTGTGTCTAACAATATGGCAAATACCGAGCAGATGGCCAAAATCGTTTCTGCA
ATCTCTGGGCTAGGAGTGCCAACCTGAGCAAGTGGCTTCTGTCACTACTGAAGACCGTA
ATTATGTGCGCAAGTGTGAGCAGTTCAGCGTTCCTTGGACCCTGATGGGAGTATAGAG
TATGAAGGCGGCGCAGTGCCTATTGACGCCATAATTGCAATCATGAAGAATGTGGG
GCTGAGGAAGGTGTGTAGACTGTATGCACCTGTGGTCTGGAACAGCATGTTGGTCAG
GAATCAGCCGCTTCTGATTGGCAGGCGATGGGTTACCCTTTCAACGCGAGATTCGC
GGCATTGACACTTTTACTATGTCACTAATCCAGCCGCAATCCAACCGATTGAGGG
GCTAATTAGAAGGCCAACAGCAGAGGAATGCATAGCGCACAAACGCCCAAGAGG
ATGGCTCTCGACAGGTCTAATAGGAATGAGAGGTTTGGCTAATCTTGAGACCGAATAC
ACAGGGGGGTTGCAAGGTGCAGAGATCGTGAGGAATCACCGAAACGCTAACAATGC
ATGAGCAAGAGATCAAAGACTGTTGTGTGTGATTTTAGTAGGTAGTAAGTTTGGTT
TGTTTGACATAAATTTGTGTGTGCACATTTCTAGAATGGCCACAGAGCGTCGTGTGG
GAGGGGGTTCGTTCTCGATACGCTAAACGTCGTCGTGCCAAATTAATTGGACGGTGCG
AGAGGTGTTACAGGATATAACCCTCCAGTTTGTAAATTCTAAGTGTGATAATAAACTT
GTCGTGTAGGTATTTCTCCCAATAGCGCTGTGGTTAATTACATTGAATTTGGAGTAG
CTGAGGCGATACCAAATCTGGTTTTAAGGGAACCTGTTGCGCATAAAGCTTAATT
AATGTATAAGTGTG.