



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**DETECÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE VÍRUS EM
MELANCIA E CONSTRUÇÃO DE NOVOS VETORES VIRAIIS
PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM CÉLULAS DE INSETO.**

Mariana Senna Quirino

Brasília/2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**DETECÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE VÍRUS EM
MELANCIA E CONSTRUÇÃO DE NOVOS VETORES VIRAIS
PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM CÉLULAS DE INSETO.**

Mariana Senna Quirino

Orientador: Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Melo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular

Brasília/2015

Ficha catalográfica

MARIANA SENNA QUIRINO

**DETECÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE VÍRUS EM
MELANCIA E CONSTRUÇÃO DE NOVOS VETORES VIRAIS
PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM CÉLULAS DE INSETO.**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Molecular da Universidade de
Brasília, como requisito parcial
para obtenção do título de
Doutora em Biologia Molecular

Aprovado em: 18 / 12 / 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Professor Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso
Professor da Universidade Rural do Rio de Janeiro

Dr^a. Simone da Graça Ribeiro
Pesquisadora da Embrapa

Prof^a Dr^a Rita de Cássia Pereira Carvalho
Professora Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a Dr^a. Eliane Ferreira Noronha
Professor Universidade de Brasília (UnB)

MEMBRO SUPLENTE:

Dr^a Michelle de Souza Fayad André
Pesquisadora da Universidade de Brasília (UnB)

AQUELE que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará. Direi do SENHOR: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei (Salmo 91).

*Dedico ao meu esposo Neto e filha
Marianne, pelo carinho e amor. Vocês
são muito importantes para mim!*

AGRADECIMENTOS

Em tudo e por tudo devemos dar graças a Deus!

À minha querida família, pelo apoio, compreensão, carinho e amor dedicado durante estes anos, entendendo minha ausência em vários momentos. Amo muito vocês!!

Ao meu orientador Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro pela oportunidade, pela ajuda, atenção e por contribuir para o meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando Lucas Melo pelas horas de ensinamento, dicas, por contribuir para o meu crescimento profissional e principalmente pela paciência.

Aos amigos do laboratório, Lorena, Deborah, Mayarah. Claudinha, Daniel, Jhon, Miguel, Fabrício, Beto, Leonardo, pela convivência e por contribuírem com o meu crescimento profissional.

Às amigas pelo incentivo e pela solidariedade nos momentos importantes dessa etapa: Anabele, Lorena, Briana, Deborah, Fábria e Jessica. Muito sucesso!

Ao Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende, pela atenção quando solicitado e por oportunizar o laboratório para desenvolver o capítulo I da minha tese.

À Dr^a Anelise Orílio, sou muito grata, por toda ajuda e pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar da Universidade Federal do Tocantins, por estar sempre disposto a me ajudar e principalmente pelo incentivo nas horas difíceis.

Aos membros da banca por aceitarem gentilmente a participar da minha Defesa de Tese e por contribuírem para o melhorar o trabalho.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de crescimento profissional.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Índice

Lista de figura	xiv
Lista de tabela	xvi
Resumo geral.....	xvii
Abstract	xviii
Introdução geral.....	19
Objetivo geral do capítulo I	21
Objetivo geral do capítulo II.....	21
CAPÍTULO I.....	22
Resumo	23
Abstract	24
1 Introdução	25
1.1 Aspectos gerais da cultura da melancia.....	27
1.2 Características gerais das famílias de vírus que infectam melancia	31
1.2.1 Família <i>Bromoviridae</i>	31
1.2.2 Família <i>Bunyaviridae</i>	32
1.2.3 Família <i>Closteroviridae</i>	34
1.2.4 Família <i>Geminiviridae</i>	35
1.2.5 Família <i>Luteoviridae</i>	36
1.2.6 Família <i>Potyviridae</i>	37
1.2.7 Família <i>Secoviridae</i>	40
1.2.8 Família <i>Partitiviridae</i>	41

1.2.9 Família <i>Tombusviridae</i>	42
1.2.10 Família <i>Virgaviridae</i>	44
1.3 Metagenômica	45
1.4 Sequenciamento de alto desempenho	46
1.4.1 Amplificação (PCR) fase sólida.....	47
2 Justificativa	49
3 Objetivos.....	50
3.1 Objetivo geral.....	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
4 Materiais e métodos	51
4.1 Plantas de melancia.....	51
4.2 Partículas virais.....	53
4.2.1 Técnica de <i>leaf dip</i>	53
4.2.2 Purificação viral e extração de RNA.....	53
4.3 Sequenciamento de alto desempenho	53
4.3.1 Triagem, montagem e análise dos <i>contigs</i>	53
4.3.2 Anotação do genoma viral	54
4.3.3 Análise da distribuição de diversidade dos genomas	54
4.3.4 Análise filogenética.....	55
4.4 Extração de RNAs	55
4.4.1 Extração de RNA total.....	55
4.4.2 Montagem do ensaio e extração de dsRNA em plantas assintomáticas.....	55
4.5 Detecção por PCR	56

4.5.1. Construção de oligonucleotídeos específicos	57
4.5.2 RT-PCR.....	59
4.6 Confirmação por clonagem e sequenciamento (Sanger).....	60
4.7 Inoculação experimental	61
4.8 Detecção por dot-ELISA em plantas hospedeiras.....	63
4.9 Detecção por RT-PCR no ensaio de plantas hospedeiras	63
5 Resultados e discussão	64
5.1 Identificação de vírus	64
5.2 Sequenciamento de análise de RNA	66
5.3 Tospovírus - GRSV	68
5.3.1 Distribuição e a frequência de SNPs	70
5.3.2 Confirmação do GRSV-TO no inóculo inicial por RT-PCR.....	71
5.3.3 Análise filogenética.....	73
5.4 Potivírus.....	77
5.4.1 PRSV	77
5.4.1.1 Distribuição e a frequência de SNPs	79
5.4.1.2 Análise filogenética	80
5.4.2 ZYMV	84
5.4.2.1 Distribuição e a frequência de SNPs	86
5.4.2.2 Análise filogenética	87
5.4.3 Amplificação com oligonucleotídeos específicos (PRSV-TO e ZYMV-TO).....	91
5.5 Partitivírus (Deltapartitivírus)	91
5.5.1 Extração de dsRNA em plantas assintomáticas	95

5.5.2 Análise filogenética.....	96
5.6 Detecção por dot-ELISA em plantas hospedeiras.....	100
5.7 Determinação da gama de hospedeiros	100
5.8 Confirmação dos vírus por RT-PCR.....	102
6 Conclusão	104
Referências bibliográficas.....	105
CAPÍTULO II	117
Resumo	118
Abstract	119
1 Introdução	120
1.1 Baculovírus.....	122
1.2 Fenótipos virais.....	122
1.3 Taxonomia.....	124
1.4 Ciclo de infecção.....	125
1.5 Expressão gênica em baculovírus	126
1.6 <i>Anticarsia gemmatilis multile nucleopolyhedrovirus</i> (AgMNPV)	129
1.7 Baculovírus como vetor de expressão - BEV.....	131
2 Justificativa	137
3 Objetivos.....	138
3.1 Objetivo geral.....	138
3.2 Objetivos específicos.....	138
4 Materiais e métodos	139

4.1 Linhagens celulares de inseto utilizadas	139
4.2 Vírus	139
4.2.1 Amplificação de partículas BV in vitro.....	139
4.2.2 Extração de DNA a partir de partículas BV	139
4.3 Bactérias	140
4.3.1 Plasmídeos utilizados	140
4.3.2 Extração de DNA plasmidial	141
4.4 Amplificação do cassette KLM	141
4.5 Construção e confirmação do plasmídeo p2100-KLM	144
4.6 Construção do vírus recombinante AgMNPV com KLM (vAgMNPV-KLM) 146	
4.6.1 Estratégia de recombinação homóloga em células de insetos	146
4.6.1.1 Co-transfecção em células UFL-AG-286 e/ou Tn-5BI- 4.....	146
4.6.1.2 Confirmação do cassette KLM no genoma do vAgGal.....	148
4.6.2 Estratégia de recombinação homóloga em <i>E. coli</i> cepa, BJ5183	148
4.6.3 Estratégia de recombinante por ligação em sítio único no genoma AgMNPV ...	151
4.6.3.1 Sítio Bsu36I	151
4.6.3.2 Sítio FseI.....	151
4.6.3.3 Avaliação da integridade genômica e replicativa de vAgMNPV-KLM	152
4.7 Obtenção de linhagem de <i>E. Coli</i> DH10BAC com bacmídeo de AgMNPV.....	152
5 Resultados e discussão	154
5.1 Amplificação do fragmento KLM e confirmação do p2100-KLM.....	154
5.2 Construção do vírus recombinante AgMNPV com KLM (vAgMNPV-KLM. 155	
5.2.1 Estratégia de recombinação homóloga por co-transfecção em células de inseto	155

5.2.1.1 Co-transfecção em células de inseto	155
5.2.1.2 Amplificação do DNA extraído do BV da co-transfecção	155
5.2.2 Estratégia de recombinação homóloga em cepa BJ5183 com vAgGal.....	158
5.2.3 Estratégia de recombinação por ligação em sítio único de AgMNPV	159
6 Conclusão	162
7 Perspectivas	163
Referências bibliográficas.....	164
Anexo capítulo I	170
Número de acesso das sequências depositada no GenBank.....	170

Lista de figura

Figura 1: Diagrama do genoma de CMV, representante da família <i>Bromoviridae</i>	31
Figura 2: Diagrama proposto para genoma de <i>Tospovirus</i>	33
Figura 3: Diagrama da organização do genoma do <i>Beet yellows vírus</i> (BYV) representante da família <i>Closteroviridae</i>	34
Figura 4: Diagrama da família <i>Geminiviridae</i> . A).....	35
Figura 5: Diagramas dos genomas da família <i>Luteoviridae</i>	37
Figura 6: Diagrama do genoma dos potyvírus representante da família <i>Potyviridae</i>	38
Figura 7: Diagrama representativo do genoma dos <i>Comovirus</i>	41
Figura 8: Diagrama representativo das partículas maduras de partitivirus e segmentos genômicos, representante dos <i>Deltapartitivirus</i>	42
Figura 9: Diagrama do genoma do <i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV), representante da família <i>Tombusviridae</i>	43
Figura 10: Diagrama do genoma da família <i>Virgaviridae</i> . O vírion em forma de bastonete	44
Figura 11: Sintomas de campo de virose comumente em folhas e fruto de melancia.....	52
Figura 12: Diagrama do genoma do PRSV, mostrando as diferentes ORFs	58
Figura 13: Diagrama do genoma do ZYMV-TO, mostrando as diferentes ORFs	58
Figura 14: Diagrama do RNA1 do vírus CiLPV-TO mostrando a ORF da RNA Polimerases.	59
Figura 15: Diagrama do RNA2 do vírus CiLPV-TO mostrando a ORF da Capa Protéica (CP)	59
Figura 16: Mapa do Brasil com o estado do Tocantins e os municípios	64
Figura 17: Folhas de melancia da lavoura de Formoso do Araguaia infectada naturalmente e MET.....	66
Figura 18: Diagrama do genoma de tospovírus.....	69
Figura 19: RT-PCR com oligonucleotídeos, para os três segmentos GRSV	72
Figura 20: Análise filogenética dos (S, M e L) das proteínas codificadas do GRSV	76
Figura 21: Diagrama proposto para a estruturação da poliproteína PRSV-TO	78
Figura 22: Análise filogenética PRSV-TO.	81
Figura 23: Análise filogenética do PRSV-TO (CP).....	83
Figura 24: Diagrama proposto para a estruturação da poliproteína ZYMV-TO.....	85
Figura 25: Análise filogenética do ZYMV-TO.....	88
Figura 26: Análise filogenética do ZYMV-TO (CP).....	90
Figura 27: Detecção dos vírus PRSV e ZYMV em plantas de melancia	91
Figura 28: Diagrama mostrando a estrutura do genoma do CiLPV-TO	94
Figura 29: Extração de dsRNA das cultivares de melancia	95
Figura 30: Análise filogenética do CiLPV-TO (CP) representante RNA1 do gênero <i>Deltapartitivirus</i>	97
Figura 31: Análise filogenética do CiLPV-TO (CP) representante RNA2 do gênero <i>Deltapartitivirus</i>	99
Figura 32: Avaliação de sintomas em gama de plantas hospedeiras no período de 30 a 40 dias após o plantio.....	101
Figura 33: Fenótipos de baculovírus maduros produzidos durante o ciclo de infecção.	123
Figura 34: Tipos de corpos de oclusão dos baculovirus.	124

Figura 35: Esquema da infecção de uma larva de lepidóptera por baculovírus.....	125
Figura 36: Liquefação do tegumento do inseto no final da infecção por baculovirus.....	126
Figura 37: Alterações morfológicas de células de inseto ao longo da infecção por baculovírus.....	128
Figura 38: Larva de <i>Anticarsia gemmatalis</i> infectadas pelo baculovírus AgMNPV	130
Figura 39: Diagrama ilustrativo da construção do baculovírus recombinante pelo método de recombinação homóloga.	133
Figura 40: Diagrama da construção de um baculovirus recombinante usando o sistema de transposição sítio-específica	135
Figura 41: Diagrama do genoma circular do AgMNPV evidenciando sítio único	143
Figura 42: Diagramas dos plasmídeos p2100 e p2100-KLM A).....	145
Figura 43: Diagrama representativo da recombinação homóloga em célula de inseto	147
Figura 44: Diagrama esquemático de recombinação homóloga em sistema de células competentes de <i>E. coli</i> da cepa BJ5183.....	150
Figura 45: Amplificação do cassete KLM por PCR.....	154
Figura 46: Gel de confirmação da construção do plasmídeo p2100-KLM	154
Figura 47: Resultado da co-transfecção em células de inseto com vetor p2100-KLM e o genoma do vírus recombinante vAgGal.....	155
Figura 48: Confirmação do vírus recombinante vAgKLM por PCR.	156
Figura 49: Perfil de restrição do possível vírus AgMNPV recombinante com <i>EcoRI</i>	157
Figura 50: Linearização do plasmídeo P2100-KLM com os oligonucleotídeos <i>SphI</i> /F e <i>PstI</i> /.....	158
Figura 51: Perfil de restrição dos clones (vAgMNPV-FseI) obtido por ligação no sítio <i>FseI</i> digerido com <i>EcoRI</i>	160

Lista de tabela

Tabela 1 Vírus identificados que infectam melancia no Brasil e outras partes do mundo	28
Tabela 2: As propriedades das diferentes proteínas de potyvírus.	39
Tabela 3: Exemplo de uso de sequenciamento por NGS para viroma de espécies de plantas infectada por vírus	48
Tabela 4: Combinações de oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.....	57
Tabela 5: Nome das famílias, espécies, cultivarers e nomes comuns das 24 plantas hospedeiras	62
Tabela 6: Resumo da analogia com genomas de vírus de plantas identificadas por NGS.....	67
Tabela 7: Identificação dos possíveis sítio de clivagem da poliproteína do vírus PRSV-TO com ligação dos dez peptídeos maduros, os números indicando a posição na sequência (aa) e número de vírus da mesma espécie.	79
Tabela 8: Resultados de nsSNP baseado nas frequências de variação entre 3 e 10% entre os reads gerados por NGS para o PRSV-TO.....	80
Tabela 9: Identificação dos possíveis sítio de clivagem da poliproteína do vírus ZYMV-TO com ligação dos dez peptídeos maduros. Os números indicam a posição na sequência (aa) e número de vírus da mesma espécie	86
Tabela 10: Resultados de nsSNP baseado nas frequências de variação entre 3 e 10% entre os reads gerado por NGS para o ZYMV-TO	87
Tabela 11: Análise dos sintomas no período de 30 a 40 dias após a inoculação e identificação por RT-PCR de vírus infectando plantas hospedeiras.	103
Tabela 12: Espécies de baculovírus modificados geneticamente para construção de bacmídeos em <i>E. coli</i> . Todos os vírus, com exceção de <i>Cydia pomonella granulovirus (Betabaculovirus)</i> , pertencem ao gênero <i>Alphabaculovirus</i>	136
Tabela 13: Descrição dos plasmídeos usados para construção dos resultados.....	141
Tabela 14: Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações das estratégias de clonagem e confirmação da inserção do KLM.....	142
Tabela 15: Programas utilizados par de oligonucleotídeos, na amplificação do fragmento relativo ao cassette KLM e para confirmação do vírus recombinante de AgMNPV	144

Resumo geral

No capítulo I avaliamos a presença e análise filogenética de vírus de melancia no estado do Tocantins. Folhas com sintomas de infecção viral foram coletadas em 2013 e partículas virais foram parcialmente purificadas e o RNA total dessas partículas foi purificado e sequenciado usando a plataforma Illumina HiSeq 2000. As sequências obtidas foram analisadas com o programa CLC Genomics Workbench, e fases abertas de leitura (ORFs) foram procuradas usando o programa *Blast x*. Os 4.912 *contigs* que obtiveram *hits* com vírus de plantas foram analisados e comparados com o auxílio do programa Geneious. A presença dos vírus foi confirmada por diferentes métodos. Foram identificados possíveis genomas completos de vírus pertencentes às famílias *Potyviridae*, *Bunyaviridae* e *Partitiviridae*. No capítulo II foi realizado estudo biotecnológico na tentativa de construção de um vetor de expressão de proteínas heterólogas com o genoma do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multile nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), baseado no sistema de transposição sítio-específica comercialmente disponível para o baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Foram utilizadas três metodologias: i) Recombinação homóloga em células de inseto; ii) Recombinação homóloga em células de *E. coli* (cepa BJ5183); iii) Digestão e ligação em sítio único *Bsu* 36I e *FseI* no DNA genômico de AgMNPV. Foi construído um vetor de transferência p2100-KLM, para recombinação homóloga e/ou ligação em sítio único do baculovírus, porém, as tentativas para construção do vetor de expressão não foram efetivas.

Abstract

In chapter I we analyzed the presence and phylogeny of viruses found in watermelon in Tocantins state. Watermelon leaves with viral symptoms were collected in 2013, and viral particles were partially purified and total RNA was extracted and sequenced using the Illumina HiSeq 2000 platform. The sequences obtained were analyzed using the CLC Genomics Workbench program, and used for ORF search with the *Blastx* program. The 4.912 contigs who got hits with plant viruses were analyzed and compared with the help of Geneious program. The presence of viruses in leaves with viral symptoms was confirmed using different methods. Possible complete viral genomes were identified and were related to viruses belonging to the families *Potyviridae*, *Bunyaviridae*, *Partitiviridae*. In chapter II we tried to construct a vector for expression of heterologous proteins using the baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). This vector was based on site specific transposition system commercially available for the baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Three methodologies were used: i) Homologous recombination in insect cells; ii) Homologous recombination in *E. coli* cells (strain BJ5183); iii) Direct ligation in *Bsu36I* and *FseI* unique restriction sites in the genomic DNA of AgMNPV. One transfer vector (p2100-KLM) was constructed for homologous recombination and / or ligation in the baculovirus single site. However, all the different strategies were not effective.

Introdução geral

Os vírus podem ser encontrados onde quer que a vida se faça presente e é provável que seja a mais abundante e diversificada forma de microrganismo no meio ambiente (Suttle, 2005; Ng et al., 2011a). Os vírus são agentes causadores de doenças em plantas e insetos economicamente importantes, bem como, em insetos-pragas e plantas invasoras (Liu et al., 2011). O aumento da compreensão de sua biologia, diversidade e evolução são de interesse dos pontos de vista fitopatológico e biotecnológico.

Nesse trabalho são abordados dois assuntos sobre vírus: i) no capítulo I foi realizado estudo de interesses fitopatológicos de vírus de planta com análises genética, filogenética e sintomatológica; ii) no capítulo II, o estudo realizado foi de interesse biotecnológico, com a tentativa de construção de vetores de expressão de proteínas heterólogas, principalmente, para a expressão de proteínas eucarióticas, utilizando Baculovírus (BEV).

Estratégias adicionais para controle de viroses em planta devem ser investigadas, pois, somente usando ferramentas da virologia clássica é difícil a detecção de todos os vírus presentes em uma cultura. Com o uso do sequenciamento de alto desempenho (do inglês, **N**ext **G**eneration **S**equencing, NGS), todos os ácidos nucleicos virais presentes em amostras de plantas com sintomas virais podem ser identificados e classificados. Como os ácidos nucleicos desses vírus estão em baixa concentração em comparação nas amostras de plantas, com de outros organismos, tais como bactéria ou células hospedeiras (genoma), essa nova metodologia é capaz de aumentar a chance de descoberta de novos vírus (Thurber et al., 2009; Barba et al., 2014).

Com a difusão dessas tecnologias a busca e o conhecimento sobre vírus entrou numa nova era (Hall et al., 2014). Atualmente, o conhecimento da diversidade de vírus de planta tem aumentado com o uso do sequenciamento por NGS, conseqüentemente, o interesse em informações sobre vírus potencialmente emergentes e ainda não identificados. Tais vírus podem ser assintomáticos e fornecerem um reservatório de biodiversidade e rearranjo para a recombinação com vírus de plantas patogênicos existentes e alguns desses vírus têm evoluído historicamente para patógenos altamente virulentos (Ng et al., 2011b). Como por exemplo, Zhou e colaboradores (1997) isolaram rearranjo entre os geminivírus (*African cassava mosaic vírus*, ACMV e *East African cassava mosaic vírus*, EACMV) associados à epidemia da doença mosaico da mandioca,

que causaram severas infecção na África. Em 2000, estudos revelaram a identificação de “novos” begomovírus (Família: *Geminiviridae*; Gênero: *Begomovirus*) e outros vírus que anteriormente eram considerados patógenos de menor importância, associados a epidemias em populações de mosca-branca *Bemisia tabaci* (Brown 2000).

O capítulo I apresenta a detecção de vírus por NGS. Os vírus foram identificados a partir de folhas de melancia (*Citrullus lanatus*) com sintomas de infecção viral coletadas em três regiões produtoras (Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Porto Nacional) do estado do Tocantins no Brasil. Observamos possíveis vírus já descritos e novos vírus para a cultura da melancia pertencentes às famílias *Potyviridae*, *Bunyaviridae* e *Partitiviridae*.

Os vírus também são utilizados como vetores de expressão de proteínas. Entre os diferentes vetores virais, os baculovírus são os mais utilizados para expressão de proteínas heterólogas em células de inseto (O'Reilly et al., 1992; Luckow et al., 1993). Baculovírus são vírus pertencente a família *Baculoviridae* restritos a invertebrados, principalmente das ordens Lepidoptera, Himenoptera e Diptera (Miller, 1997; Jehle et al., 2006). São infectivos em células de insetos e por possuírem promotores fortes, como os dos genes *p10* (gene da proteína fibrosa de 10 kDa) e poliedrina (*polh*), expressos ao final do ciclo de infecção, podem produzir proteínas em sua maioria biologicamente ativas e com processamento pós-traducional de uma célula eucariótica, sem afetar o ciclo de infecção do vírus (Ribeiro et al., 2015).

No Capítulo II foram feitas tentativas para construção de vetor de expressão sítio-específica no genoma de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) utilizando três estratégias. Este sistema facilitaria a manipulação do genoma de AgMNPV e estudos funcionais de genes. Além disso, o desenvolvimento de um vetor de expressão baseados em outros vírus serviria como alternativa aos sistemas de expressão de genes heterólogos existentes.

Objetivo geral do capítulo I

Identificar e analisar vírus detectados por NGS em folhas de melancia nas lavouras dos municípios de Formoso do Araguaia, Porto Nacional e Lagoa da Confusão do estado do Tocantins, Brasil.

Objetivo geral do capítulo II

Construir vetor de expressão sítio-específica baseado no genoma de AgMNPV para expressão de proteínas heteróloga de interesse biotecnológico e estudo molecular básico.

CAPÍTULO I

DETECÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE VÍRUS EM MELANCIA

Resumo

A cultura de melancia (*Citrullus lanatus*) é atacada por diferentes pragas e patógenos, como os vírus. Um conjunto (*pool*) de folhas de melancia com sintomas de infecção por vírus, foram coletadas entre setembro e dezembro de 2013 com representantes de três regiões produtoras do estado do Tocantins no norte do Brasil. A partir desse *pool* de folhas com sintomas de virose, os vírus foram semi-purificados por ultracentrifugação. Em seguida, o RNA total foi extraído desta fração enriquecida com partículas virais e uma biblioteca de RNAseq foi preparada e sequenciada pela plataforma Illumina HiSeq 2000. Quarenta milhões de *reads* foram geradas e tratadas usando o programa CLC *Genomics Workbench*, que resultou em cerca de cinquenta mil *contigs*. Todos foram submetidos a análises por *Blastx* contra uma base de dados contendo sequências virais. Um total de 4.912 *contigs* foram obtidos com identidades junto às sequências virais. Apenas os *contigs* com identidade de sequência junto a vírus de plantas foram selecionados, identificados e anotados. Genomas virais completos pertencentes às famílias *Potyviridae*, *Partitiviridae*, and *Bunyaviridae* foram identificados. O maior *contig* (10,371 pb) mostrou 91% de identidade com *Papaya ringspot vírus* (PRSV). Outro *contig* de 9.666 pb apresentou 98% de identidade com *Zucchini yellow mosaic vírus* (ZYMV). Foram encontrados também dois *contigs* de 1.575 e 1.606 pb relacionados com o RNA 1 e RNA 2 da família *Partitiviridae*. Curiosamente, estes *contigs* possuem 98% de identidade de amino ácidos (aa) com CP e RdRp de *Citrullus lanatus criptic vírus* (CiLCV) uma nova espécie de vírus pertencente à família *Partitiviridae*. Outros *contigs* tiveram identidade com os três segmentos do genoma de *Groundnut ringspot vírus* (GRSV), uma espécie de tospovirus da família *Bunyaviridae*. O primeiro com o segmento de RNA L de 8,876 pb com 98% de identidade de aa com o isolado de GRSV/TCSV - reassortant (NC_015469); O segundo com o segmento de RNA M de 4.847 pb com 98% de identidade de aa com o isolado GRSV (AY574055); enquanto o terceiro com o segmento de RNA S de 3.074 pb com 99% de identidade com isolado GRSV/TCSV, reassortant (NC_015467). Experimentos com a gama de hospedeiros e plantas de melancia foram realizados para análise da sintomatologia, sorologia, RT-PCR e sequenciamento (Sanger). A análise filogenética confirmou os vírus anotados. Foi observado diferença entre os sintomas no campo e os obtidos em condição de estufa, em alguns casos, os sintomas reproduzidos foram típicos de espécies de potyvirus. Os vírus PRSV-TO e ZYMV-TO foram detectados por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos e os vírus GRSV-TO e CiLP-TO não foram amplificados. O NGS é excelente ferramenta para identificação viral, unida às investigações complementares. Este trabalho sequenciou e fez a caracterização molecular e filogenética do primeiro genoma completo de GRSV e de um novo vírus infectando melancia, da família dos *Partitiviridae* do gênero *Deltapartitivirus* no Brasil. Trabalhos futuros serão necessários para confirmação dos vírus identificados.

Abstract

Watermelon (*Citrullus lanatus*) it is susceptible to several viral pathogens. Watermelon leaves with viral symptoms were collected from September to December 2013 in three production regions of Tocantins state in the northern of Brazil. By ultracentrifugation, viruses were semi-purified from leaf material presenting typical viral symptoms. Total RNA was then extracted from this virus-enriched fraction and a RNAseq library was prepared and sequenced by Illumina HiSeq 2000 platform. Forty million reads were generated, and after quality trimming and *de novo* assembly using CLC Genomics Workbench software, nearly fifty thousand contigs were obtained. All contigs were submitted to blastx analyses against a viral RefSeq database. A total of 4,912 contigs matched with viral sequences available in public databases and only plant viruses were selected. Viral genomes belonging to the families *Potyviridae*, *Partitiviridae*, and *Bunyaviridae* were identified. The largest contig (10.371 bp) showed 91% identity with *Papaya ringspot virus*. Another contig of 9.666 bp presented 98% identity with *Zucchini yellow mosaic virus*. We also found two contigs of 1.575 and 1.606 bp related to the RNA 1 and RNA 2 of *Partitiviridae*. Interestingly, these contigs shared 98% amino acid (aa) identity with RdRp and CP of *Citrullus lanatus cryptic virus* (CiLCV), suggesting a new viral species belonging to the *Partitiviridae* family. Moreover, we found contigs with high identity to *Groundnut ringspot virus* (GRSV), a tospovirus species from family *Bunyaviridae*. The L RNA segment of 8.876 bp shared 98% aa identity with other GRSV/TCSV - reassortant (NC_015469); M RNA segment of 4.847 bp shared 98% aa identity (AY574055); while the S RNA segment of 3.074 bp presented 99% identity with GRSV/TCSV - reassortant (NC_015467). Overall, we identified four complete virus genomes in watermelon plants. Biological experiments (host range and symptomatology), serological, and molecular RNA sequencing and evolutionary experiments were performed to characterize these viruses. The difference between field symptoms and those observed under greenhouse conditions indicated, in some cases, typical symptoms of potyvirus species.

1 Introdução

Plantas da família Cucurbitaceae são cultivadas em todo o mundo por seus frutos comestíveis. Esta família inclui a melancia, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai, uma fruta de forte importância econômica e social no norte do Brasil, com amplo mercado nacional e internacional. O Brasil é o quarto maior produtor de melancia, representando 2% da produção mundial com uma área cultivada de 90.000 ha e uma produção de mais de 2 milhões de toneladas no ano de 2013 (FAO 2015). No estado do Tocantins, a produção vem crescendo com 199 mil toneladas nos dois últimos anos (SEAGRO, 2015).

Vírus são encontrados infectando todos os organismos vivos e são diversos e abundantes. Vírus que infectam plantas são responsáveis pela redução tanto no rendimento quanto na qualidade de diversas culturas em todo o mundo. Diferentes vírus que infectam melancia pertencem às famílias: *Potyviridae* (*Papaya ringspot virus*, type watermelon PRSV-W, vírus do mosaico do mamoeiro -W; *Watermelon mosaic virus* WMV, vírus do mosaico da melancia; *Zucchini yellow mosaic virus* ZYMV, vírus do mosaico amarelo da abobrinha-de moita); *Bromoviridae* (*Cucumber mosaic virus* CMV, vírus do mosaico do pepino); *Comoviridae* (*Squash mosaic virus* SqMV, vírus do mosaico da abóbora); *Bunyaviridae*, (*Zucchini lethal chlorosis virus* ZLCV, vírus da clorose letal da abobrinha zucchini) (Rezende et al., 2013); *Groundnut ringspot virus* GRSV, vírus da mancha anular do amendoim foram encontrados em campos de melancia no Brasil (Leão et al., 2015).

O conhecimento atual da diversidade de vírus de plantas baseia-se em doenças economicamente importantes e pouco se sabe sobre os vírus que não causam doenças graves (Terao et al, 2010; Pereira et al., 2007). A metagenômica viral é o método que vem sendo aplicada, para avaliar a diversidade e abundância de componente e/ou vírus completos em um determinado ambiente. Várias tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (NGS) têm sido utilizadas e revelado a presença de muitos vírus que são, em grande parte, ignorados pela detecção convencional (Clokier et al., 2011). A tecnologia da plataforma de RNA-seq Illumina é uma ferramenta que pode ser usada para facilitar a identificação, caracterização e classificação taxonômica de vírus. Permite fazer a análise da diversidade e variabilidade de vírus com detecção de partes de sequências ou mesmo genomas inteiros (Liu et al, 2011; Ng et al, 2011b; Zhou et al, 2010).

A fim de analisar a presença e a diversidade de vírus nas áreas de cultivos de melancia no norte do Brasil, em 2013 foi sequenciado o RNA total de possíveis partículas

virais semi-purificadas de folhas de melancia com sintomas virais de diferentes áreas do Estado do Tocantins, realizado através da plataforma RNA-seq Illumina.

1.1 Aspectos gerais da cultura da melancia

A melancia (*C. lanatus*) é uma fruta saborosa e nutritiva, atualmente pode ser encontrada em toda parte do mundo, sendo a espécie de maior evidência do gênero *Citrullus*. Caracteriza-se geneticamente por ser diplóide com um número haplóide de $n = 11$ cromossomas ($2n = 22$). As cultivares com sementes são diploides e as cultivares sem sementes são triplóides. (Levi et al., 2012).

A melancia é uma curcubitacea nativa da África do Sul e África Central, herbácea de hábito rasteiro e suas variedades são apresentadas de diferentes formas quanto ao fruto, coloração externa e polpa. A espécie selvagem, pode ser encontrada por toda Ásia, mas, na África do Sul ocorre de maneira natural. A entrada no nordeste do Brasil se deu pelo ciclo da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) introduzida pelos escravos africanos (Romão et al., 1999; Levi et al., 2012). O segundo registro foi pela utilização de cultivares melhoradas de origem americana e japonesa em São Paulo (Queiroz 2004).

O maior produtor de melancia no mundo, com 62% do total da produção, é a China e o Brasil detém 2% da produção mundial. O quarto lugar na produção mundial, sendo superado pela Turquia e Irã (FAO 2015). A melancia apresenta relevância no cenário do agronegócio brasileiro e é considerada uma das mais importantes olerícolas, mas superada pela batata, tomate e cebola (IBGE, 2014). No Tocantins essa cultura ocupa 7.000 ha com produtividade de 30 t/ha e os municípios Formoso do Araguaia e Lagoa da Confusão detêm 89% da produção no estado (SEAGRO, 2015)

No nordeste e sul do Brasil, o cultivo de melancia deixou de ser uma cultura explorada apenas no período das chuvas. Passou a ser uma atividade tecnificada, praticada por pequenos e médios produtores e empresas, cuja produção é destinada ao mercado externo (Queiroz 2004; Dias et al., 2010). Ao norte do Brasil é praticada por pequenos produtores em regime de agricultura familiar, conferindo à cultura além de importância econômica, grande importância social. Atualmente, é cultivada em todo o Brasil devido as condições edafoclimáticas favoráveis em todas as regiões para o desenvolvimento, qualidade do fruto e produtividade.

Infecções por vírus afetam seriamente a qualidade e a produção agrícolas em todo o mundo e especialmente nos países com baixo nível tecnológico, onde medidas de controle adequadas não são praticadas (Lima et al 2012). A virose pode tornar-se fator limitante à produção de melancia. (Terao et al., 2010). Na tabela 1 são mostradas espécies virais identificadas infectando melancia no Brasil e em outras partes do mundo.

Tabela 1 Vírus identificados que infectam melancia (*Citrullus lanatus*) no Brasil e outras partes do mundo (adaptado de Ali et al., 2012)

Família	Gênero	Espécies/ Acrônimo	Vetores	Referência	Relatado no Brasil
<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfamovirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus (AMV)</i>	Afídio	Ali et al., 2012	Não
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>	Afídio	Lima et al., 1997	Sim
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Watermelon silver mottle virus (WSMoV)</i>	<i>Tripes</i>	Rao et al., 2011	Não
		<i>Watermelon bud necrosis virus (WBNV)</i>	<i>Tripes</i>	Krishnareddy et al., 1993	Não
		<i>Melon severe mosaic virus (MeSMV)</i>	<i>Tripes</i>	Ciuffo et al., 2009	Não
		<i>Melon yellow spot virus (MYSV)</i>	<i>Tripes</i>	Chen et al., 2008	Não
		<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>	<i>Tripes</i>	Iwaki et al., 1984	Não
		<i>Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV)</i>	<i>Tripes</i>	Bezerra et al., 1999	Sim
		<i>Groundnut ringspot virus (GRSV)</i>	<i>Tripes</i>	Leão et al., 2015	Sim
<i>Closteroviridae</i>	<i>Crinivirus</i>	<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)</i>	Mosca branca	Polston et al., 2008	Não
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Squash leaf curl virus (SLCuV)</i>	Mosca branca	Lazarowitz et al., 1991	Não
		<i>Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV)</i>	Mosca branca	Lecoq et al., 1994; Kheyr-Pour	Não

				et al., 2000; Al-Musa et al., 2011	
		<i>Cucurbit leaf crumple virus (CuLCrV)</i>	Mosca branca	Polston et al 2008	Não
<i>Luteoviridae</i>	<i>Polerovirus</i>	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)</i>	Afídio	Bananej et al., 2006	Não
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Papaya ringspot virus (PRSV)</i>	Afídio	Lima et al., 1980;	Sim
		<i>Soybean mosaic virus (SMV)</i>	Afídio	Ali et al., 2012	Não
		<i>Watermelon mosaic virus (WMV)</i>	Afídio	Lima et al., 1997.	Sim
		<i>Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)</i>	Afídio	Vega et al., 1995; Poltronieri et al., 2000	Sim
		<i>Moroccan watermelon mosaic virus (MWMV)</i>	Afídio	Arocha et al 2008	Não
	<i>Ipomovirus</i>	<i>Squash vein yellowing virus (SqVYV),</i>	Mosca branca	Egel et al., 2007	Não
		<i>Cucumber vein-yellowing virus (CVYV)</i>	Mosca branca	Bananej et al 2006	Não
<i>Partitiviridae</i>	<i>Deltapartitivirus</i>	<i>Citrullus lanatus cryptic virus (CiLCV)</i>	Semente / fungo	Sela et al., 2013	Não
<i>Secoviridae</i>	<i>Comovirus</i>	<i>Bean pod mottle virus (BPMV)</i>	Coleopteros	Ali et al., 2012	Não
		<i>Squash mosaic virus (SqMV)</i>	Coleopteros	Lima et al. 1985	Sim
	<i>Nepovirus</i>	<i>Tobacco ringspot virus (TRSV)</i>	Nematoide	Abdalla et al., 2012	Não
<i>Tombusviridae</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Melon necrotic spot virus</i>	Semente	Avgelis 1989	Não

		(MNSV)			
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)</i>	Semente / fungo	Choi 2001; Wu et al., 2011	Não
		<i>Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)</i>	Semente / fungo	Choi 2001;	Não

1.2 Características gerais das famílias de vírus que infectam melancia

1.2.1 Família *Bromoviridae*

A família *Bromoviridae* possui seis gêneros: *Alfamovirus*, *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilarvirus*, *Oleavirus*. São caracterizados por apresentar três segmentos de RNA de fita simples, encapsidados em três partículas de 28 nm de diâmetro (de Ávila et al., 2007; El-borollosy et al., 2013). A estrutura do seu genoma (Figura 1) são três RNAs: Os RNA 1 (~3,4 kb); RNA 2 (~3,1 kb), são associados com a replicação viral e o RNA 3 (~2,2 kb) codifica para a proteína de movimento e proteína de encapsidação (CP) com *cap* na extremidade 5'. A CP é geralmente exigida para a circulação sistêmica e pode ser necessária para a propagação de célula-a-célula, em alguns generos (King et al., 2011). Os vírions são morfologicamente icosaédricos (esférico ou quase esférico), para o gênero *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* e *Ilarvirus*, com 26-35 nm de diâmetro. Os gêneros *Alfamovirus*, *Ilarvirus* e *Oleavirus* se apresentam baciliforme com diâmetros de 18-26 nm e de 30 a 85 nm comprimentos (Zitter et al., 2009; King et al., 2011).



Figura 1: Diagrama do genoma de CMV, representante da família *Bromoviridae*. O genoma é constituído de três moléculas de mRNA de cadeia simples, designadas: O RNA 1 (3,4 kb); RNA 2 (3,1 kb) com ORF2a e ORF2b; RNA 3 (2,2 kb) com ORF da proteína de movimento (MP) e ORF3b a proteína capsídeo (CP), com cerca de 1 kb (Adaptado: ViralZone, 2015).

Os vírus são predominantemente transmitidos por insetos (afídeos, besouros), na forma não persistentes ou mecanicamente (Palukaitis et al 1992; Terao et al., 2010). Para alguns membros da família os vetores não foram identificados. Eles são distribuídos em todo o mundo e várias espécies são responsáveis por grandes epidemias viróticas na agricultura (King et al., 2011). A gama de hospedeiros é muito ampla infectam cerca de 1000 espécies, incluindo cereais, frutas, legumes e plantas ornamentais (Zitter et al., 2009). Membros dessa família podem infectar naturalmente tomate e alcachofra e também são encontrados infectando plantas daninhas (King et al., 2011).

1.2.2 Família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* contém mais de 350 espécies de vírus divididos em cinco gêneros *Hantavirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Tospovirus* (revisito em 131 espécies) (Hogehout et al., 2008). O gênero *Tospovirus* é único dentro do *Bunyaviridae* que infectam plantas, os outros gêneros infectam animais vertebrados. Quatro gêneros possuem vírus que são transmitidos por vetores artrópodes (Fauquet et al., 2005) e o gênero *Hantavirus* com espécies que infectam pequenos mamíferos (Jonsson et al., 2010).

O aspecto morfológico diferencia entre os vírus de cada gênero. O gênero *Tospovirus* será descrito de forma mais detalhada por seus vírus infectarem somente plantas. Sua gama de hospedeiros é muito ampla infectando mais de 925 espécies de plantas dentro de 70 famílias botânicas de monocotiledoneas e dicotiledoneas e dentre essas, algumas são economicamente importantes (King et al., 2011).

Geralmente os vírions são esféricos ou pleomórficos, com 80-120 nm de diâmetro. Apresentam projeções de glicoproteína na superfície de 5-10 nm que são incorporados em uma bicamada lipídica do envelope. Os vírions são envelopados a partir de membranas celulares de Golgi da célula infectada (Hogehout, et al., 2008; Pappu et al, 2009; King et al., 2011).

O genoma viral é segmentado possui três moléculas ssRNA (Figura 2). O segmento L designada (grande), M (médio) e S (pequena), um total de 11-19 kb. Os segmentos M e S de tospovírus utilizam uma estratégia de codificação ambisense. O RNA S codifica a proteína não estrutural supressora de silenciamento gênico (NSs) e a proteína do nucleocapsídeo (N). O RNA M codifica a proteína de movimento célula-a-célula (NSm) e as glicoproteínas precursoras do envelope viral (G_N , G_C) necessárias nas interações vírus-vetor e montagem da partícula viral. O RNA L possui polaridade negativa, codificando uma RNA polimerase viral dependente de RNA (RdRp) (Takeda et al, 2002; Hogehout et al., 2008; Pappu et al, 2009; King et al, 2011;). Os nucleotídeos terminais de cada segmento de RNA genoma são base-emparelhados, de forma quase circular (ribonucleocapsídeos). As sequências terminais dos segmentos genômicos são conservados entre os vírus, com oito nucleotídeos nas extremidades 5'NTR AGAGCAAU e 3' NTR UCUCGUUA (King et al, 2011).

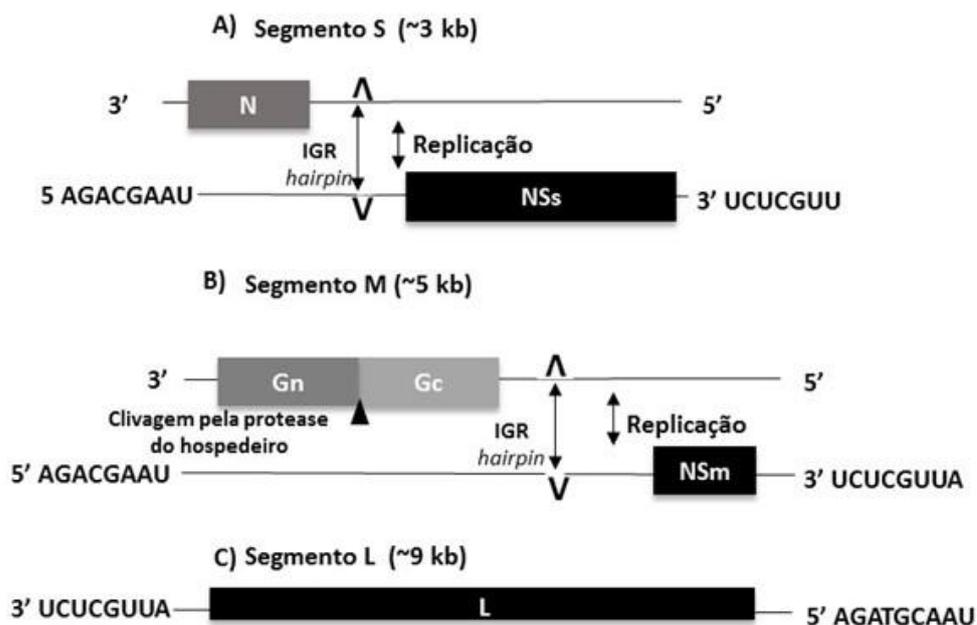


Figura 2: Diagrama proposto para genoma de *Tospovirus*. O genoma é de RNA segmentado, linear e sentido negativo. ORF para as proteínas virais, sequência intergênica (IRG) com a formação do hairpin e os oito nucleotídeos complementares presentes nas extremidades dos segmentos, conhecidos como regiões conservadas na extremidade 5' NTR (AGACGAAU) e na NTR 3' (UCUGCUUA) (Kormelink 2011). A) Segmento de RNA S que codifica a proteína não estrutural (NSS) na orientação senso (5'-3') e a proteína da nucleocápside (N) em orientação anti-sense (3'-5') e entre 1491 e 2151 nts com região intergênica (IRG) e formação do hairpin (3.074 pb). B) Segmento de RNA M, que codifica a proteína não estrutural (NSm) na orientação senso (5'-3') e o precursor da glicoproteína (GN / GC) na orientação anti-sense (3'-5'); local de clivagem pela protease do hospedeiro (triângulo preto) e entre os 1003 e 1357 nts, região intergênica (IRG) com formação do hairpin (~5 pb). C) Segmento RNA L (RdRp) na orientação anti-sense (3'-5') (~9 pb) (adaptado ViralZone 2015).

Os tospovírus são predominantemente transmitidos por insetos conhecido como trípés da ordem Thysanoptera, propagando o vírus por toda parte do mundo, tendo mais de uma espécie que podem transmitir o vírus (Pappu et al, 2009). Pelo menos treze espécies já foram identificadas pertencentes aos seguintes gêneros: *Frankliniella* (9 espécies), *Thrips* (2 espécies), *Scirtothrips* (1 espécie), *Ceratothripoides* (1 espécie) (King et al., 2011). Sua transmissão ocorre de modo persistente, os vírus são adquiridos pelos trípés durante estágio larval quando se alimentam da seiva de plantas infectadas. As tospovirose causam infecção sistêmica em plantas hospedeiras nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas, onde provocam maior dano, muitas vezes resultam em nanismo grave, o que conduz à morte (King et al., 2011; Kormelink et al., 2011).

1.2.3 Família *Closteroviridae*

Os vírus pertencentes à família *Closteroviridae* infectam plantas, os vírions tem as partículas filamentosos de forma helicoidal, variando em comprimento de 650 nm (espécies com genoma fragmentado) para mais de 2000 nm (espécies com genoma monopartido) (Melzer et al., 2013; Martelli et al., 2014). O corpo do vírion é montado pela principal proteína do capsídeo (CP) e a cauda da proteína do capsídeo menor (CPM). O genoma é formado pela molécula de RNA fita simples (ssRNA) de sentido positivo, monopartido com tamanho variando 15,5-19,3 kb. Destaca-se como os maiores vírus de plantas conhecidos (Martelli et al., 2014). Codifica para as proteínas CP, CPM e as induzidas por a choque térmico (*Shock protein 70 homolog*, Hsp70), envolvidas na formação das partículas dos closterovírus (King et al., 2011).

A família é composta por quatro gêneros *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Crinivirus* e *Velarivirus*, que diferem no tipo de genoma (monopartido, bipartido ou tripartido), tamanho e em comportamento epidemiológico (Martelli et al., 2014). Sua análise filogenética é baseada em motivos conservado da proteína Hsp70 e a principal proteína de revestimento a CP (Figura 3). Estes genes são usados para identificação da família e têm sido alvo de estudos para as variabilidade genética e evolução dos membros da família (Martelli et al., 2002; Tzanetakis, et al., 2007).

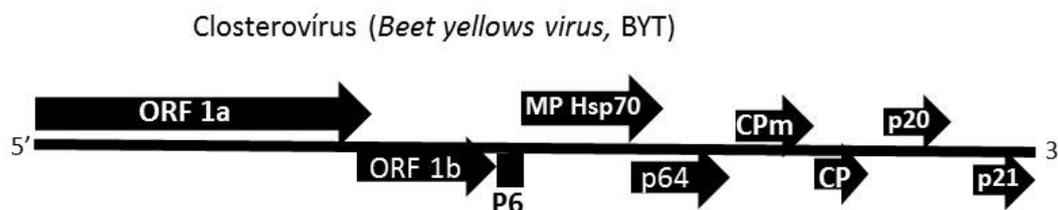


Figura 3: Diagrama da organização do genoma do *Beet yellows vírus* (BYV) representante da família *Closteroviridae*. A posição relativa das ORFs e seus produtos de expressão são mostrados na figura. Na extremidade 3' um conjunto de RNAs subgenômicos (sgRNAs). ORF 1a codifica proteínas para replicação (L-Pro, Hel) e a ORF 1b (RdRp). As demais codificam: proteínas de movimento (P6; MPHsp70; CPM); CP proteína de revestimento. No final da extremidade 3' (p20, p21) proteína supressora de silenciamento gênico (adaptado King et al., 2011).

Closterovírus são transmitidos por afídios; ampelovírus por cochonilhas e crinivírus por mosca branca. Os vetores do velarivírus não são conhecidos (Martelli et al., 2002; 2014). Exceto para velarivírus, todos são transmitidos de forma não persistente independentemente do tipo de vetor e são patogênicos para uma ampla gama de culturas herbáceas e lenhosas, a que podem causar grandes danos.

1.2.4 Família *Geminiviridae*

Com base na organização do genoma, inseto-vetor e gama de hospedeiros a família *Geminiviridae* é diferenciada em sete gêneros *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Mastrovirus*, *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus* (King et al., 2011; Khan et al., 2015). Membros desta família são vírus de plantas que têm genomas ambisense, a partir de ORFs no sentido viral (V) e complementar (C). Possuem molécula de DNA de fita simples (ssDNA), circular de 2,5 - 3,0 kb, com vírions encapsidado e não envelopado (Figura 4). Estruturalmente caracterizados pela morfologia geminada da partícula viral, denominados vulgarmente como geminivírus (Khan et al., 2015) e geneticamente por possuir uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA (King et al., 2011). Diferentes componentes genômicos são necessários para o processo infeccioso, como os ssDNA satélites (King et al., 2011).

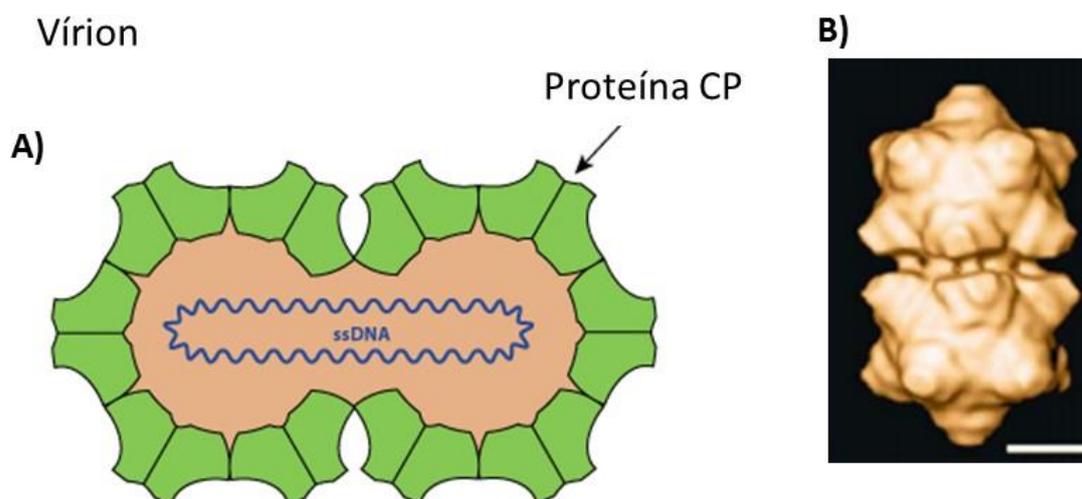


Figura 4: Diagrama da família *Geminiviridae*. A) Vírion não envelopados, geminada em cada partícula geminada contendo apenas único ssDNA circular e capsômeros com a proteína CP. B) cryoEM (Cryo-Microscopia Eletrônica) e reconstrução, partícula de *Maize streak virus* (MSV) (adaptado ViralZone 2015 e King et al 2011)

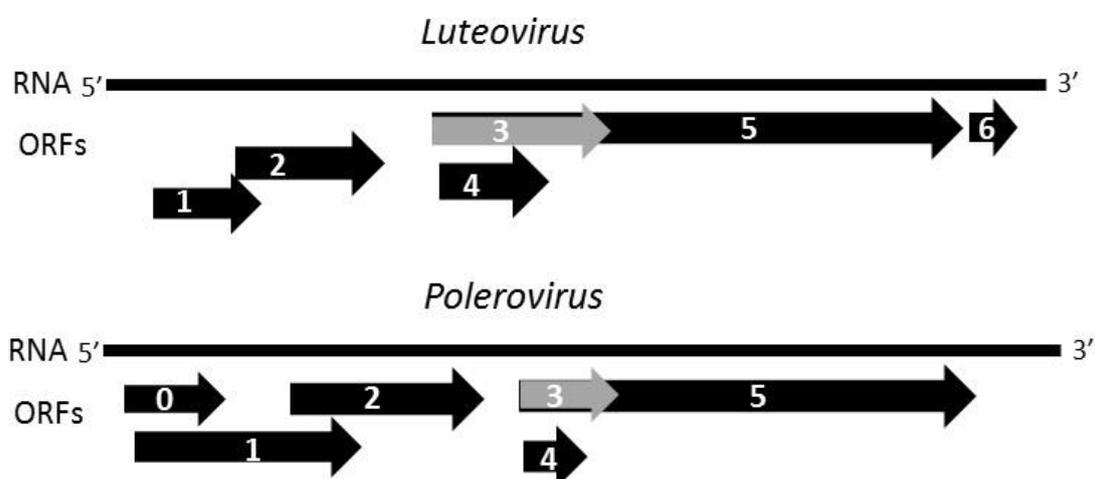
Distintos geminivírus podem infectar plantas monocotiledoneas, dicotiledoneas e também são encontrados em infecções mistas (King et al., 2011). São vírus importantes, dos quais causam sérios prejuízos sobre ampla variedade de plantas, sendo considerada a segunda família mais numerosas entre os fitovírus, ultrapassada apenas pela família *Potyviridae*. As doenças causadas por geminivírus, provavelmente podem ter surgido devido a diferentes fatores, abrangendo também a recombinação de diferentes geminivírus co-infectando uma planta e, com isso possivelmente surgindo vírus mais

virulentos (Bridson et al., 1996).

1.2.5 Família *Luteoviridae*

Os membros da família *Luteoviridae* pertencem aos gêneros *Luteovirus*, *Polerovirus* e *Enamovirus* (King et al 2011). Os vírus são transmitidos afídeos. Grande parte dos seus membros são restritos a uma família de plantas hospedeiras, mas outros membros infectam diferentes plantas de várias famílias. Por exemplo, *Beet western yellows virus* (BWYV), que infecta mais de 150 espécies de plantas em mais de 20 famílias (King et al 2011).

Os vírions contêm uma única molécula linear de ssRNA, sentido positivo, que é responsável pela infecção. O tamanho do genoma é bastante uniforme variando de 5,6 kb a 6,0 kb (King et al., 2011). Os RNAs genômicos possuem cinco ou seis ORFs diferenciadas entre os seus três generos são: ORF 1 e 2 (sobrepostas), codificam proteínas relacionadas à replicação (RdRp, RNA polimerases dependentes de RNA); ORF 3, responsável pela codificação da CP viral e a ORF 4, envolvida na codificação da proteína para o movimento a longa distância, à qual é transcrita a partir de uma mudança da fase da leitura da ORF 3; ORF 5, codifica a proteína de transmissão, que só é expressa quando não ocorre o reconhecimento da extremidade 3'da ORF 3 (Pfeffer et al., 2002; King et al., 2011). A ORF 0, possivelmente codifica uma proteína envolvida na supressão de silenciamento gênico e os luteovírus produzem um ou dois sgRNAs adicionais, o maior contém ORF 6 (Terradot et al., 2001; King et al., 2011). Na figura abaixo estão os diagramas para os genomas dos três gêneros pertencente a esta família (Figura 5).



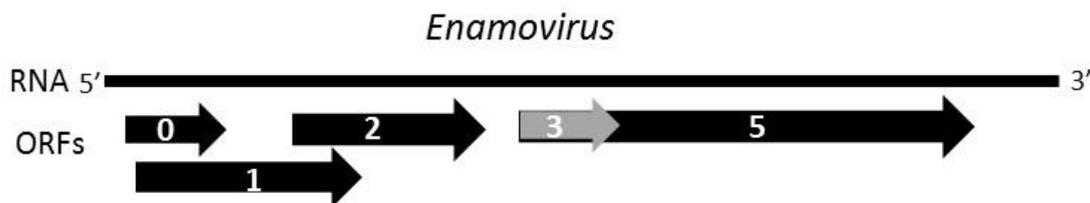


Figura 5: Diagramas dos genomas da família *Luteoviridae*. Diagrama dos genomas da família *Luteoviridae* com gêneros *Luteovirus*, *Polerovirus* e *Enamovirus*. Os números de 0 a 5 correspondem às ORFs, respectivamente. O gênero *Luteovirus* contém a ORF 6 (adaptado King et al., 2011).

As diferenças entre os três gêneros estão principalmente na extremidade 5' dos seus genomas. Os RNAs não possuem cauda poli (A) na extremidade 3' NTR e apresentam uma pequena proteína VPg (*Virion Protein Genome Linked*) covalentemente ligada à extremidade 5' nos gêneros *Polerovirus* e *Enamovirus* e os vírions apresentam de 25 a 30 nm de diâmetro e não são envelopados (King et al., 2011).

1.2.6 Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* consiste em vírus de planta com sete gêneros: *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus* e *Brambyvirus*. Os critérios para identificação do gênero são de acordo com o inseto vetor e o número de componentes do genoma viral, que são conservados dentro da família, com exceção do gênero *Bymovirus* que apresenta genoma bipartido (King et al., 2011).

Os vírus pertencentes à família possuem características distintas que causam infecção em planta e são considerados mais importantes, com 146 espécies identificadas e 17 espécies em estudos. Alguns vírus infectam uma estreita gama de hospedeiras e outros, infectam até 30 famílias de plantas hospedeiras (King et al., 2011). Os vírus do gênero *Potyvirus* são transmitidos por afídeos de forma não persistente; *Rymoviruses* e *Tritimoviruses* são transmitidas por ácaros, de forma não persistente. *Bymovirus* são transmitidas por fungos que infectam raiz. *Ipomoviruses* parece se transmitido por mosca branca. Membros da família *Potyviridae* são transmitidos com facilidade por inoculação mecânica de plantas infectadas para plantas saudáveis (King et al., 2011; Simmons et al 2011).

O seu genoma é formado por RNA fita simples (ssRNA) sentido positivo e, partículas longas filamentosas e flexuosas (Figura 6). Nos genomas possuem a proteína VPg (*Virion Protein Genome Linked*) covalentemente ligada à extremidade 5' NTR e na extremidade 3' NTR é poliadenilado (poli A). Com uma grande ORF que codifica uma

poliproteína grande que se auto cliva e forma um conjunto de proteínas funcionais (King et al., 2011). Há uma ORF curta adicional denominada PIPO sobreposta na região genômica correspondente à proteína P3. Provavelmente atua como uma proteína de movimento (Chung et al., 2008; King et al., 2011).

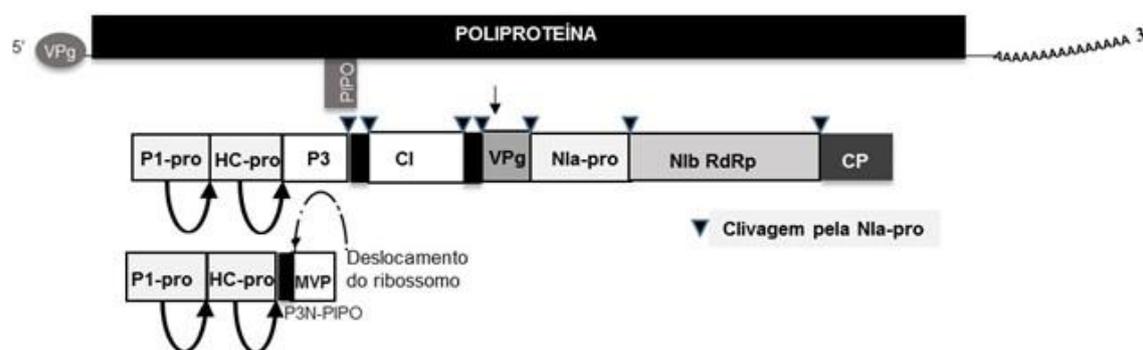


Figura 6: Diagrama do genoma dos potyvirus representando da família *Potyviridae*. A linha horizontal representa o RNA genômico com única fase aberta de leitura (open reading frame-ORF), localizada entre as duas regiões não codificadoras denominadas 5'NTR com VPg e 3'NTR com cauda poli A. A poliproteína é clivada em proteínas funcionais do vírus, através da atividade proteolítica de três proteases de origem viral (P1, HC-Pro e NIa). Assim, a protease NIa catalisa sua própria clivagem e outras seis clivagens, enquanto P1 e HC-Pro agem apenas efetuando suas próprias clivagens. Há uma pequena ORF, que indica as proteínas P3N-Pipo, expressa por um desvio ribossômico e uma ORF P3 sobrepostas, a PIPO (adaptado: ViralZone: Potyvirus 2015).

A poliproteína é clivada por três proteases codificadas pelo próprio vírus denominadas P1, HC-Pro e NIa, atuando em locais específicos em cada espécie. As proteases P1 e HC-Pro autoclivam-se e a NIa está envolvida em seu próprio processo de clivagem em *cis* e em seis clivagens adicionais em *trans*, no total de oito a dez peptídeos maduros (Adams et al., 2005; Chung et al., 2008; Azad et al., 2014) (Tabela 2).

Tabela 2: As propriedades das diferentes proteínas de potyvírus (adaptada King et al., 2011; Chung et al., 2008).

Proteínas	Funções
P1 (32-64 K)	<ul style="list-style-type: none"> • O primeiro produto da poliproteína potyviral, é uma proteína cujas funções durante o ciclo de infecção são desconhecidas; • Contribui para o ciclo de infecção do vírus, mas não é essencial; • Um domínio carboxi terminal de serina-protease que catalisa a sua clivagem a partir do próprio poliproteína viral; • Exibe forte de atividade de ligação ao RNA; • Tamanho das sequências nucleotídicas, são variáveis em diferentes espécies do gênero.
HC-Pro (56–58 K) “Helper component-proteinase”	<ul style="list-style-type: none"> • Uma cisteína proteinase que auto-cliva a poliproteína viral no C-terminal; • Sintomatologia • Transmissão pulgão • Circulação sistêmica • Inibe a defesa do hospedeiro, supressão de silenciamento gênico
P3 (37 K)	<ul style="list-style-type: none"> • Patogenicidade planta; • Possivelmente âncoras para o complexo de replicação na membrana.
6K1	Funcionalidade desconhecida. Entretanto, sugere-se que pode estar envolvida, juntamente com a P3, na patogenicidade e replicação do genoma viral
6K2	<ul style="list-style-type: none"> • Âncora do complexo de replicação viral às membranas intracelulares
VPg (<i>Virion Protein Genome Linked</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Um iniciador, durante a síntese do RNA viral, estabelece uma interação importante, como fator de iniciação com hospedeiro eucariótico; • Replicação do genoma.
NIa (49 K) “Nuclear inclusion protein”	<ul style="list-style-type: none"> • Localização celular; • Uma protease serina que em cis e trans cliva a maioria da poliproteína potyviral; • Está envolvida na replicação do vírus.
NIb (58 K) “Nuclear inclusion protein b”	<ul style="list-style-type: none"> • Replicação do genoma RNA polimerase dependente de RNA • Envolvida na replicação do genoma
CI “Cylindrical inclusion protein”	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína tem atividade de helicase de RNA e de NTPase e podem estar envolvidos no movimento célula a célula; • Forma inclusões citoplasmáticas cilíndricas denominadas “cata-vento”
CP (28–40 K) Proteína do capsídeo	<ul style="list-style-type: none"> • Montagem de virion, principal proteína estrutural, muitas vezes tem papel na produção de sintoma e transmissão (afídio); • Movimento célula-a-célula e circulação sistêmica (movimento virais);
P3n-PIPO	<ul style="list-style-type: none"> • Provavelmente atua como uma proteína de movimento

Uma característica importante na classificação das espécies dentro família *Potyviridae* são as formações de inclusões cilíndricas formada pela proteína CI denominadas “cata-vento” (Urcuqui-Inchima et al, 2001; King et al., 2011). Possuem sequências gênicas e proteica conservadas em toda a família, responsáveis pela interação com afídios o motivo conservado de aminoácidos denominados DAG (Asparagina - Asp, Alanina Ala, Glicina - Gly), localizada na região N-terminal da CP. Na região N-terminal da HC-Pro estão os tetrapeptídico Lys (lisina) - Ile (Isoleucina) / Leu (leucina) -Thr (treonina) / Ser (serina) - Cys (cisteína) denominado KITC dentro de um motivo rico em

Cys. Outro motivo conservado encontra-se fora do domínio N-terminal, localizado na região central da HCPro, o motivo Thr-Lys-Pro (prolina), denominado PTK (Urcuqui-Inchima et al, 2001).

1.2.7 Família *Secoviridae*

A família *Secoviridae* é formada pelos gêneros: *Comovirus*, *Flabavirus* e *Nepovirus*, *Cheravirus*; *Sadwavirus*; *Torradovirus*; *Sequivirus*; *Waikavirus* (King et al., 2011; Thompson et al., 2014). Todos os membros da família infectam plantas, com gama de plantas e sintomas que diferenciam de acordo com o hospedeiro e gênero do vírus (King et al., 2011).

Os vírions são isométricos, icosaédrica, não envelopado e com cerca de 30 nm de diâmetro. Mono (*Sequivirus*; *Waikavirus*) ou bipartido com RNA fita simples (ssRNA) linear, sentido único de cadeia positiva e uma estratégia de expressão para poliproteína, com processamento subsequente. A extremidade 5' NTR tem uma proteína ligada ao genoma VPg (*Virion Protein Genome Linked*) e na grande maioria o RNA viral é poliadenilado (poli A) na extremidade 3' NTR. A replicação possui uma estratégia que forma um sistema em bloco contendo a helicase tipo III, proteinase cisteína 3 C-like, polimerase de I tipo (Hel-Pro-RdRp). A replicação do genoma segue o modelo de replicação do vírus de ssRNA (+) replicam-se no citoplasma da célula do hospedeiro (Thompson et al., 2014).

Dentro da família, os vírus compartilham uma proteína chamada proteína de movimento e / ou proteína CP adaptado para esta função. As vias de transmissão são mecânicas e por vetores (nematóides; ácaros; trípes, afídios e besouros). Atualmente, são hospedeiras naturais de 73 espécies botânicas, divididas entre 11 gêneros. A análise filogenética realizada com base nas suas proteínas de replicação (Pro-RdRp), resultou no agrupamento separado e distinto de linhagem dentro do ramo picornavírus (Sanfacon et al., 2009; King et al., 2011).

Um diagrama do genoma de *Comovirus* (bipartido), representante da família *Secoviridae* pode ser observado na Figura 7. O RNA 1 codifica VPg, proteína envolvida na replicação; Helicase (Hel); Proteases (Pro); Polimerase (Pol). O RNA 2 codifica a proteína do capsídeo viral (CPL e CPS) e a proteína de movimento (MP) célula-a-célula (King et al 2011).

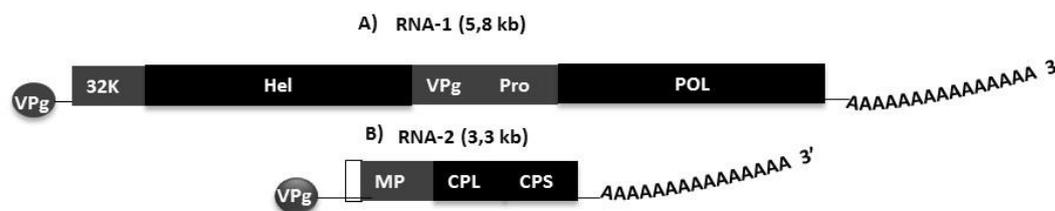


Figura 7: Diagrama representativo do genoma dos *Comovirus*. O genoma é composto por duas moléculas de ssRNA que codifica duas poliproteínas, e cada segmento genômico tem uma pequena proteína VPg, que é covalentemente ligada à extremidade 5' do RNA, enquanto a extremidade 3' é constituída de cauda poli-A). O RNA 1 uma poliproteína com sequências características de helicase (Hel); proteases (Pro) e polimerases (Pol). B) RNA 2 codifica duas proteínas do capsídeo viral (CPL e CPS) e de movimento célula-célula (MP) (adaptado: ViralZone 2015).

1.2.8 Família *Partitiviridae*

A família *Partitiviridae* está dividida em cinco gêneros: *Alphapartitivirus* e *Betapartitivirus* com vírus que infectam plantas e/ou fungos; *Gamapartitivirus* com vírus que só infectam fungos; *Deltapartitivirus* com vírus que só infectam plantas e o vírus do gênero *Cryspovirus* que infectam protozoários (Nibert et al. 2014).

O genoma dos vírus que infectam fungos e plantas têm dois segmentos genômicos dsRNA 1 e dsRNA 2, cada um contendo um grande ORF. A ORF codifica uma RNA polimerase viral dependente de RNA (RdRp) e a que codifica a proteína do capsídeo (CP), respectivamente. As partículas dos vírus são isométricas com diâmetros entre 25 e 40 nm e são encapsulados separadamente tornando estes vírus bipartidos (King et al., 2011; Nibert et al., 2014).

Como em outros vírus de dsRNA, cada partícula contém uma cópia de RdRp que é usada para a síntese do RNA positiva (transcrição) usando o RNA negativa do genoma como molde. No caso de partitivírus, a transcriptase parece ser semiconservativa, o que significa que o RNA positiva é sintetizado de novo e retido dentro da partícula como parte de dsRNA enquanto que o dsRNA genômico positiva, é expelido e usada na tradução por ribossomos e / ou empacotada para uma nova partícula de partitivírus (Nibert et al., 2014) (Figura 8).

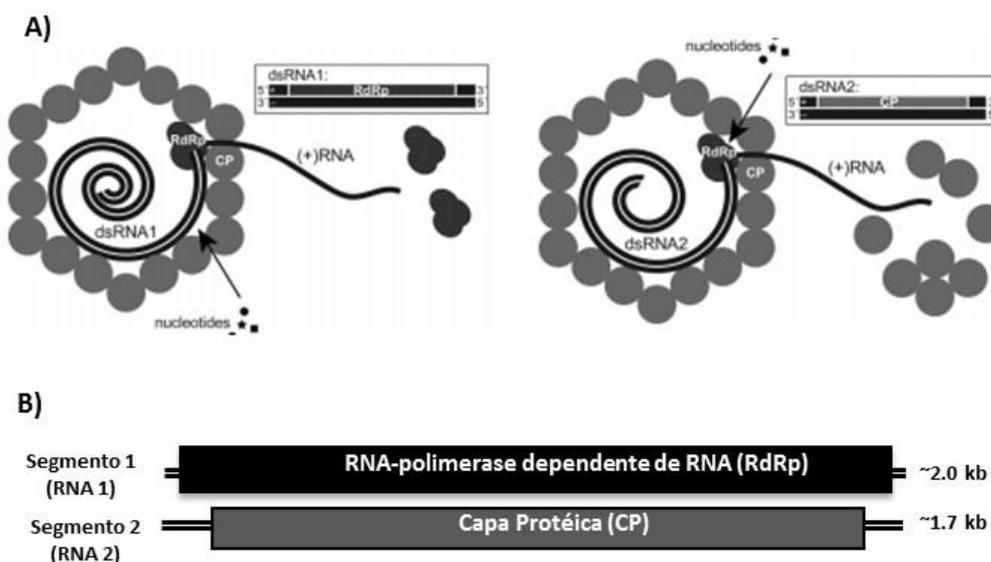


Figura 8: Diagrama representativo das partículas maduras de partitivírus e segmentos genômicos, representante dos *Deltapartitivirus*. A) Diagrama dos segmentos do genoma que codificam RdRp (dsRNA1) e CP (dsRNA2) são empacotados dentro capsídeos, separadamente formados por múltiplos (total 120) cópias da CP (cinza claro). Um ou duas cópias de RdRp (cinza escuro) também são empacotadas dentro de cada capsídeo, presumivelmente ligada à superfície interior da capsídeo e associada a extremidade do segmento genômico (incluindo o 3' terminal da menor cadeia de RNA, que serve como molde para a iniciação da transcrição) (Nibert et al., 2014). B) Esquema representativo do genoma de dsRNA da família Partitiviridae, constituído por duas moléculas de RNAs, com cada segmento genômico monocistrônico. O segmento 1 (2,0 kb) RdRp; O segmento 2 (~1,7 kb) CP (adaptado: ViralZone 2015).

Os vírus do gênero *Deltapartitivirus* só infectam plantas (Nibert et al., 2014) e já foram descritos em diferentes famílias de plantas, mas não causam sintomas visíveis (Ghabrial et al., 2005). São transmitidos através de semente e ainda que tenha titulação alta não podem ser transmitidos por enxertia ou inoculação mecânica. Pois, ainda não foram relatadas para a família Partitiviridae proteínas relacionadas com movimento ou homólogos de outros vírus de planta. Sua transmissão ocorre de forma passiva por divisão celular, sementes e pólen infectados (Ghabrial et al., 2005; 2008; 2011).

1.2.9 Família Tombusviridae

A família *Tombusviridae* inclui treze gêneros; doze dos quais contêm vírus com os genomas de fita simples de RNA de sentido positivo que codificam proteínas do capsídeo (CP). Os membros do gênero *Umbravirus*, não codifica a proteína da CP e é encapsidado pela CPs de vírus "ajudante" (vírus satélites). Os outros doze gêneros são: *Tombusvirus*, *Carmovirus*, *Aureus Virus*, *Arenavirus*, *Machlomovirus*, *Alphanecrovirus*, *Betanecrovirus*, *Panicovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Macanavirus* e *Zeavirus* (King et al., 2011; Scheets et al., 2015).

Esta família engloba uma ampla variedade de vírus, com 71 espécies de vírus que infectam uma ampla gama de plantas hospedeiras reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (King et al., 2011). A transmissão ocorre principalmente por inoculação mecânica e através de material vegetal de propagação e alguns podem ser transmitidos por contato ou através de semente. Os vírus são frequentemente encontrados em ambientes naturais, águas de superfície e solos, ou seja, podem ser adquiridos sem a assistência de vetores.

O genoma constitui uma molécula de ssRNA linear, sentido positivo, com cerca de 3,7 a 4,8 kb, dependendo do gênero (Figura 9). Com a exceção dos vírus do gênero *Dianthus* contêm dois RNAs genômicos (bipartido) de aproximadamente 3,8 kb e 1,4 kb. A extremidade 5' NTR do genoma é descapsidado. As extremidades 3' não são poliadenilado (poli A). O RNAs interferentes defectivos (DI-RNAs) ocorrer em alguns gêneros e em outros RNAs satélites ou vírus satélites (King et al., 2011; Scheets et al., 2015).

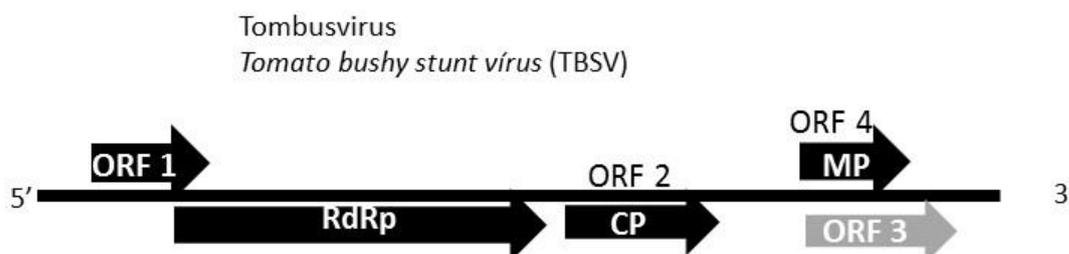


Figura 9: Diagrama do genoma do *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), representante da família *Tombusviridae*. O genoma é de cerca de 4,7-4,8 kb e contém quatro ORF. A ORF CP está localizada internamente no RNA genômico. ORFs 3 e 4 são 3' localizado ORF4 e está contido dentro do ORF3 em uma fase de leitura diferente. Ambas as ORFs são expressas a partir de um segundo sgRNA de cerca de 0,9 k. A organização do genoma as setas representam as ORFs abaixo e ao longo da barra horizontal. As ORF 1 indica as proteínas de polimerase (possui sequência conservada dentro da família *Tombusviridae*). A ORF 2 a CP (possui sequência conservada entre outros gêneros dentro da família *Tombusviridae*). A ORF 3 codifica a MP. A ORF 4 codifica o supressor de silenciamento. As linhas por baixo representam os dois sgRNAs que são sintetizados nas células infectadas. As ORFs sob as sgRNAs correspondem às proteínas codificadas, ou seja, o CP, o supressor de RNA de silenciamento e a proteína movimento (MP).

A replicação ocorre no citoplasma, em vesículas membranosas que podem ser associados com retículo endoplasmático, ou organelas modificadas tais como peroxissomas, mitocôndrias e, mais raramente, cloroplastos. Os vírions estão presentes no citoplasma e, ocasionalmente, em mitocôndrias e núcleos e todas as espécies provocam a formação de corpos de inclusão multivesiculares (King et al., 2011)

1.2.10 Família *Virgaviridae*

A família *Virgaviridae* consiste em vírus de planta com vírion em forma de bastonete. Inclui os gêneros *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* e *Tobravirus*. As características principais dos membros da família são baseadas em análise filogenética dos genes, principalmente para a proteína de replicação “alfa-like”, característica típica desta família (Adams et al., 2009a; King et al., 2011).

O genoma é monopartido ou bipartido (dependendo do gênero considerado), linear, ssRNA (+). O RNA genômico exibe uma estrutura de RNAt, na extremidade 3', mas não tem cauda poli-A. São vírions não envelopados, hastes helicoidais rígidas com uma simetria helicoidal, cerca de 20-25 nm de diâmetro, com um "canal" central. Pode haver um, dois ou três segmentos, dependendo do gênero considerado (King et al., 2011) (Figura 10).

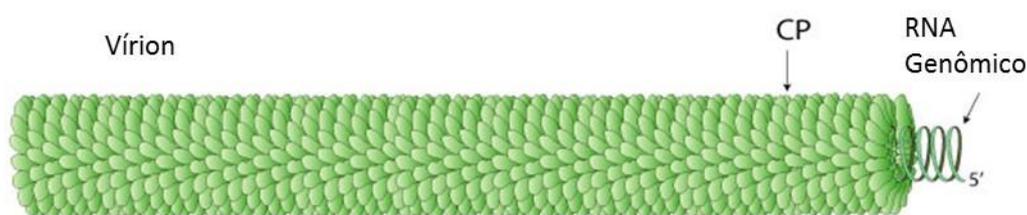


Figura 10: Diagram do genoma da família *Virgaviridae*. O vírion em forma de bastonete. A proteína do capsídeo (CP) formado por múltiplas cópias de um único polipeptídeo (adaptado ViralZone, 2015)

A expressão gênica do RNA do vírion é infecciosa e serve tanto como o genoma quanto para RNA mensageiro viral. As ORFs de RNA-1 extremidade 5' próxima são traduzidas diretamente para produzir os componentes do complexo da replicase viral e a RdRp é traduzida através da supressão da terminação no final da ORF1 (Adams et al., 2009a; King et al., 2011). Dependendo do gênero o capsídeo é formado por múltiplas cópias de um único polipeptídeo de cerca de 17-24 kD. Alguns vírus codificam uma proteína do capsídeo adicional (CP) produzido pela supressão da CP pelo o códon de parada para produzir em outra fase de leitura uma proteína maior (RT) de massa variável chamada de CP-RT (King et al., 2011).

Os vírions infectam uma ampla gama de espécies de plantas (mono- e herbáceas e dicotiledoneas), mas a gama de hospedeiros de membros individuais é normalmente limitada. Todos os membros podem ser transmitidos experimentalmente por inoculação mecânica e, para o gênero *Tobamovirus* são transmitidos por contato mecânico,

decorrente das práticas culturais, em resíduos vegetais, no solo e na água por vários anos; enquanto os membros do gênero *Hordeivirus* são transmitidos através do pólen e sementes (Adams et al., 2009a).

1.3 Metagenômica

De acordo com a virologia clássica a detecção de vírus é realizada com a propagação do vírus em cultura celular, uma técnica responsável pela identificação da grande maioria dos vírus conhecidos até as últimas décadas. Contudo, muitos vírus não podem ser facilmente propagados em cultura de células, limitando a exploração e o conhecimento em menos de 1% sobre a diversidade viral existente (Mokili et al., 2012).

Uma nova metodologia denominada de metagenômica está crescendo. A análise em conjunto do material genético encontrada em quase toda a superfície de ambientes bióticos e abióticos, como por exemplo: corpo humano; amostras de solo; amostras de plantas; amostras de água e vários outros (Barba et al., 2014). Esta análise gera abundância de ácido nucleico, a partir dos organismos-modelo presente, sem a necessidade de isolar em laboratório as espécies em meio de cultivo seletivo (Rappé et al., 2003; Handelsman, 2004; Hall et al., 2014).

Geralmente, as técnicas usadas na caracterização de novas espécies de vírus são limitadas às regiões conhecidas e altamente conservadas dos genomas. As técnicas como por exemplo, a PCR degenerada (Wang et al., 2002), são usadas para a detecção de alguns patógenos simultaneamente, como estirpe específica, espécies individuais ou pequeno grupo de patógenos presente em uma planta (Lara-Victoriano et al., 2011). Assim, na tentativa de mitigar esses problemas, estudo da metagenômica viral tem demonstrado ser eficaz na descrição de novos vírus pelo sequenciamento de uma amostra ambiental (NG et al 2009b), uma vez que, não requer nenhum conhecimento do hospedeiro ou patógeno. (Edwards et al., 2005; Delwart 2007; Adams et al., 2009b). Adicionalmente, o método fornece acesso à composição dos genes nas comunidades microbianas existente no ecossistema e, assim, dá uma descrição mais ampla em comparação a outros métodos como a filogenia, que são muitas vezes baseadas apenas na diversidade de um gene, por exemplo, o gene 16S rRNA (Thomas et al., 2012).

Projetos de metagenômica viral têm sido desenvolvidos em diferentes superfícies e ecossistemas para caracterização de novos vírus, como em amostras fecais (Victoria et al., 2009), de sangue (Breitbart et al., 2005; Jones et al., 2005), amostras de

tecido pulmonares (NG et al., 2009 a; Willner et al., 2009); e Tumor (doença neoplásica) (NG et al 2009 b). Na última década, a metagenômica tem sido aplicada para explorar a diversidade de vírus presentes em vetores (NG et al 2011 a) e plantas (Adams et al., 2009b; Lara-Victoriano et al., 2011).

1.4 Sequenciamento de alto desempenho

Os avanços na tecnologia de sequenciamento em grande escala de genoma, bem como, a forma como esta informação pode ser analisada (Oetting, 2010) impulsionaram e aceleraram o desenvolvimento de sequenciamento de alto desempenho (*Next Generation Sequence* - NGS) em substituição ao método automatizado de Sanger et al. (1977). A tecnologia do NGS revolucionou o processo de sequenciamento genômico com a geração de bilhões de sequências de uma vez de forma rápida e a baixo custo (Metzker, 2010; Zhou et al., 2010; Barba et al., 2014). O número de sequências disponíveis nos bancos de dados genômicos vem crescendo exponencialmente com uso de modernas plataformas de sequenciamento desenvolvidas no final da década de 1990 e comercializadas por volta de 2005. Duas destas plataformas usadas por NGS (Roche 454 GS System®, Life Technologies AB SOLiD System® e Illumina Genome Analyzer®) têm demonstrado satisfazer o mercado (Zhou et al., 2010). A plataforma HiSeq 2000 (Illumina) tem obtido destaque, pois gera 600 bilhões de bases (600 Bbp) por corrida, relação custo benefício em projetos que exigem alto desempenho e boa cobertura genômica com baixa taxa de erros (Radford et al., 2012; Barba et al., 2014). A principal desvantagem são os fragmentos curtos gerados para leitura (*reads*) de até 150 pb (Metzker, 2010).

Apesar dos índices de qualidade e estimativas de precisão serem fornecidas por cada fabricante, não há concordância de que “base de qualidade” de uma plataforma é equivalente ao de outra plataforma (Metzker, 2010). A combinação única de protocolos específicos distingue uma tecnologia da outra, mas, alguns fatores são considerados importantes para a seleção de uma plataforma de sequenciamento NGS. Dentre eles, incluem o tamanho do genoma (ou o tamanho esperado) a ser estudado, a sua complexidade (incluindo o teor de G + C), cobertura e precisão necessária. Aliados aos serviços de bioinformática com diferentes tipos de análise de sequenciamento de DNA ou RNA (Barba et al., 2014).

1.4.1 Amplificação (PCR) fase sólida

O processo conhecido como PCR de fase sólida ocorre em uma superfície sólida de vidro gerando clones (*clusters*), que confere a plataforma Illumina um aspecto inovador para o método NGS (Fedurco et al., 2006).

A tecnologia desenvolvido parte do princípio de ciclo de terminação reversível (CRT) da molécula de DNA (Metzker, 2010). Esta técnica utiliza terminadores reversíveis em um processo cíclico que compreende a incorporação de nucleotídeos, imagens de fluorescência e clivagem do radical terminador (todo esse processo ocorre dentro de uma câmara) (Metzker, 2010; Zhou et al., 2010; Barba et al., 2014).

Os adaptadores da superfície também atuam como iniciadores na amplificação por PCR, adicionados às misturas contendo os reagentes de amplificação de PCR na superfície da célula de fluxo (lâmina de vidro). Depois de vários ciclos da PCR, cerca de 1000 cópias de fragmentos de DNA de cadeia simples são criadas e fixados à superfície (cluster) formando uma colônia (Zhou et al., 2010). Imagens são realizadas para determinar a identidade do nucleotídeo incorporado com base na respectiva fluorescência. Ocorre a incorporação de outro nucleotídeo na cadeia crescente de DNA e repete-se o ciclo (Metzker, 2010).

O método por NGS é mais uma ferramenta molecular e tem oportunizado o estudo de etiologia, genomas, evolução e detecção de surtos de doenças infecciosas além das interações entre patógeno e hospedeiro, incluindo a descoberta de novos vírus em animais e plantas (Barba et al., 2014; Studholme et al., 2011). A vantagem da utilização dessa técnica é fornecer dados de sequências a partir de fragmentos de biblioteca de ácido nucleico (DNA, cDNA), evitando a necessidade de clonagem em vetores plasmidiais para a aquisição da sequência (Metzker, 2010; Voelkerding et al., 2009). Na Tabela 3 estão alguns exemplos de viroma de plantas sequenciados pela a plataforma Illumina com abordagem específica nas moléculas de DNA e/ou RNA.

Tabela 3: Exemplo de uso de sequenciamento por NGS (plataforma Illumina) para viroma de espécies de plantas infectada por vírus (adaptada de Barba et al., 2014).

Hospedeiros	Fins do estudo /Viroma	Preparo das amostras / target	Referência Bibliográfica
<i>Nicotiana benthamiana</i> e <i>Arabidopsis thaliana</i>	Características resultante da associação de siRNAs de <i>Bamboo mosaic virus</i> e sua interferência e não interferência no RNA satélite de diferentes plantas. A composição global de siRNAs e vírus satélite em RNAs das plantas infectadas e a ação que reflete nos RNAs do vírus e satélite; DCLs em diferentes plantas hospedeiras	siRNAs (vírus e satélites)	Lin et al., 2010
Arroz (rice)	Caracterização de siRNAs de <i>Rice stripe virus</i> em quarto genomas de RNAs infectando plantas de arroz.	siRNAs	Yan et al., 2010.
Algodão	Caracterização de siRNAs de <i>Cotton leafroll dwarf virus</i> (gênero <i>Polyerovirus</i> , família <i>Luteoviridae</i>) infectando plantas de algodão.	siRNAs	Silva et al., 2011.
Tomate	siRNAs de <i>Tomato spotted wilt virus</i> foram usados para detectar o vírus em tomate infectados antes que os sintomas apareceram em níveis baixos para os métodos de detecção convencionais. Além disso, utilizado na análise das <i>quasi espécies</i> de vírus e para a identificação de um tospovírus não especificada e um geminivírus squash	siRNAs	Hagen et al., 2011.
Uva	Detecção e identificação de <i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i> , <i>Hop stunt viroid</i> , <i>Citrus exocortis Yucatan viroid</i> e <i>Citrus exocortis viroid</i> , de ambas as amostras, sintomáticos e não sintomáticos, dos reads de RNA total de folhas de videira infectadas.	RNA total tratado com <i>Dnase</i>	Poojari et al., 2013
Lima (<i>Citrus</i>)	Famílias miRNA identificados que são expressos diferencialmente em cima de infecção de árvores de lima mexicano com <i>Candidatus Phytoplasma aurantifolia</i> . O estudo aumenta a compreensão da base molecular da doença vassoura de bruxa que pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias para o seu controle.	miRNAs foi isolados a partir de tecidos infectados e sem infecção	Ehya et al 2013

2 Justificativa

A melancia (*Citrullus lanatus*) é uma olerícula importante para agricultura mundial, com uma produção de 75 milhões de toneladas / 3,1 milhões ha (FAO, 2013). No Brasil está entre as cinco olerícolas mais importantes, com 2 milhões de toneladas / 90 mil ha, com destaque para produção na região norte que vem crescendo e em 2013 chegou a 30 mil toneladas / 7 mil ha, só no estado do Tocantins. Os municípios Lagoa da Confusão e Formoso do Araguaia foram responsáveis por 89 % da produção do estado (IBGE, 2014; SEAGRO-TO, 2015). As maiores regiões produtoras no estado, apresentaram lavouras com folhas e frutos com sintomas típicos de infecção viral com redução da qualidade dos frutos para o mercado.

O conhecimento sobre a diversidade de vírus de planta vem a partir do estudo, em grande parte, da diagnose realizada pela virologia clássica. Embora, muitas vezes bem-sucedidos estas técnicas podem apresentar desvantagens significativas, especialmente quando se tenta identificar os agentes “desconhecidos”, por exemplo, ou um patógeno que infecta um novo hospedeiro, ou sem caracterização molecular. Contudo, estes dados são frequentemente incompletos ou mesmo totalmente ausente, especialmente para muitos hospedeiros infrequentes ou novos. Baseando-se no sequenciamento por NGS, que pode ser usado para a investigação, identificação e caracterização de vírus conhecidos e desconhecidos em plantas infectadas é que o presente estudo foi desenvolvido.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Identificar e analisar vírus detectados por NGS em folhas de melancia com infecção viral de três regiões produtoras do estado do Tocantins, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar vírus descritos, bem como novos vírus;
- Analisar a diversidade genética dos vírus eleitos
- Caracterizar a frequência de SNPs;
- Realizar análise filogenética dos vírus eleitos.

4 Materiais e métodos

4.1 Plantas de melancia

Amostras de folhas de plantas de melancia das cultivares Manchester e Top Gun exibindo sintomas de infecção viral foram coletadas em *pool* no ano de 2013 em 20 lavouras situadas nos municípios de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Porto Nacional, áreas produtoras de melancia do estado do Tocantins, Brasil. Os sintomas observados em campo foram mosaicos, bolhas, redução do limbo foliar, anéis cloróticos, necrose na haste floral, exsudato no fruto e redução no desenvolvimento da planta e fruto (Figura 11). No laboratório de Manejo Integrado de Pragas do Campus Universitário de Gurupi – Universidade Federal do Tocantins (UFT) foram selecionadas as folhas que apresentavam sintomas mais severos de virose e identificada com: nome do cultivar; data (mês e ano) e local.



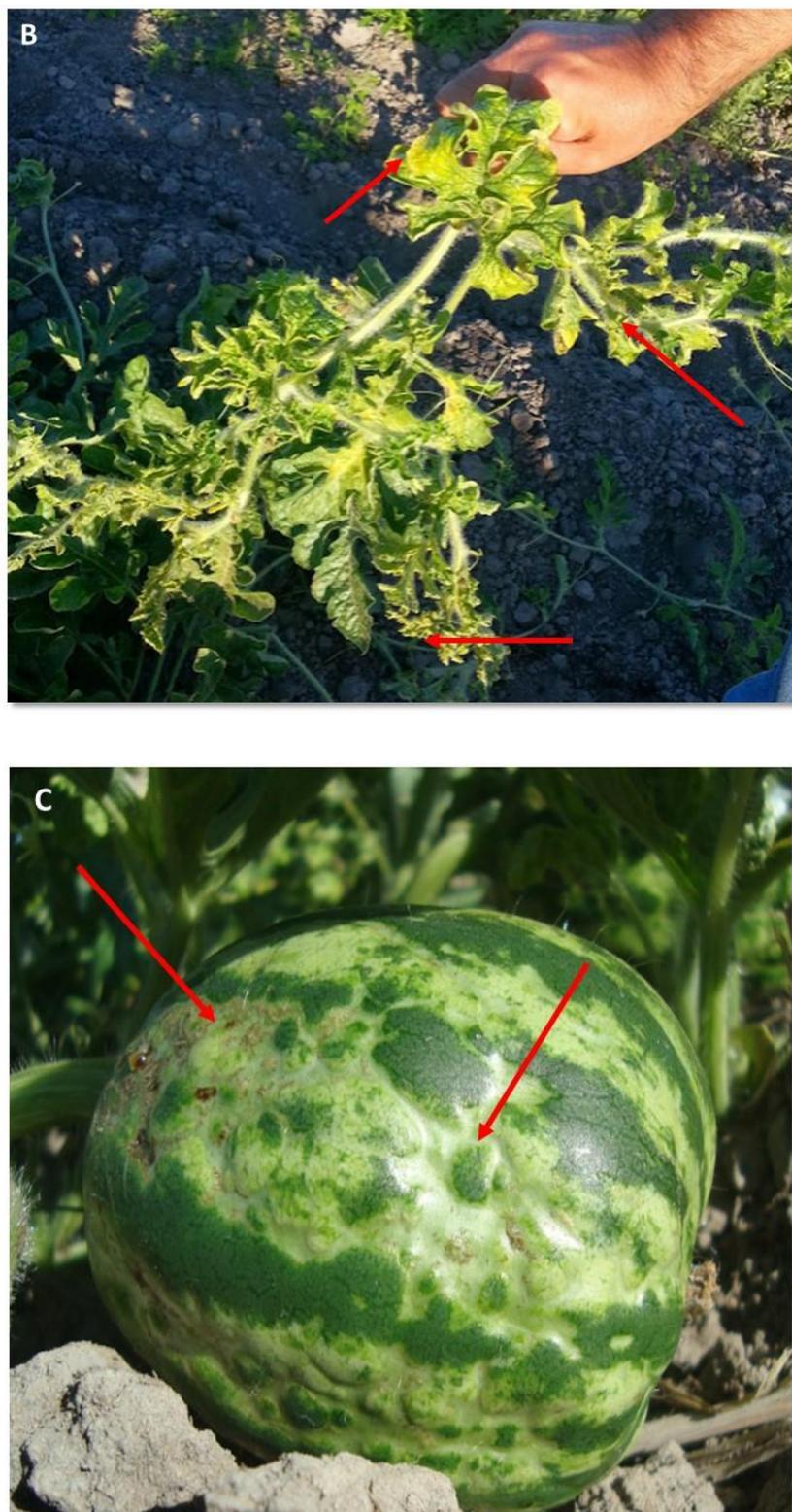


Figura 11: Sintomas de campo de virose comumente em folhas e fruto de melancia. A) As setas indicam sintomas de bolhas e clorose. B) As setas indicam deformação foliar e mosaico. C) As setas indicam fruto de melancia com redução, pontuações necróticas, deformação e exsudatos do fruto. (Lavouras: (A) Lagoa da Confusão e (B e C) Formoso do Araguaia).

4.2 Partículas virais

4.2.1 Técnica de *leaf dip*

A observação das partículas virais foi realizada pela técnica de imersão foliar rápida ("*leaf dip*") descrita por Kitajima (1965). O microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011 a 80 Kv) do Laboratório de Virologia do departamento Biologia Celular e Molecular da UnB (Universidade de Brasília) foi utilizado para obtenção das micrografias.

4.2.2 Purificação viral e extração de RNA

A partir das folhas de melancia sintomáticas dos três campos foi realizada uma mistura (*pool*) com 50g/campo, para enriquecimento do material genético. Inicialmente foi realizada uma semi-purificação com objetivo de limpar e concentrar as partículas virais presente. O material vegetal (150g) foi triturado em liquidificador com 500 mL de tampão fosfatado (0,1 M Fosfato Disódico e Fosfato Monosódico, pH 7,5 + EDTA 1 mM pH 8,0) e + 0.2% de β -mercaptoethanol (adicionado na hora). O extrato foi centrifugado por 20 minutos a 5.000 x g, 4 °C (centrífuga preparativa – Beckman/ J2-MI Rotor SW-14). Em seguida, os 500 mL (fase aquosa superior) foram transferidos para tubos de ultracentrifugação (Beckman) os quais foram mantidos em gelo. Logo após, foi adicionado aos tubos uma solução de sacarose 25% (colchão de sacarose) e realizada a ultracentrifugação por 75 min a 80.000 x g, 4 °C (Beckman/COULTER – USA - Rotor SW-28) (adaptado Veerisetty et al., 1978). O sedimento formado foi diluído em 2 mL de tampão fosfatado (0,1 M, pH 8) e a purificação de RNA foi realizada com o kit "RNeasy Mini Kit Flora" (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. Um dos problemas em manipular RNA é a sua instabilidade. Caso a amostra esteja degradada, o resultado é uma taxa muito baixa de *reads* mapeados. Na tentativa de se manter a qualidade do RNAs o isolado do extrato vegetal foi enviado em RNASTable (@RNASTable - Biomatrix) para sequenciamento Illumina HiSeq 2000, Macrogen Inc (Coreia do Sul)

4.3 Sequenciamento de alto desempenho

4.3.1 Triagem, montagem e análise dos *contigs*

Os *reads* obtidos pelo sequenciamento (Illumina HiSeq 2000) foram submetidos a triagem e/ou limpeza pelo programa CLC Genomics Workbench (CLC Genomic

Workbench versão 6.0.3) para deixar todas as sequências com boa resolução, por exemplo, a remoção de sequências de baixa qualidade (*end trimming*). Em seguida foi realizada a montagem, mais especificamente, o processo de combinar *reads* em porções contíguas de DNA (*contigs*) baseando-se na similaridade entre os *reads*.

Para o presente trabalho foi criado um banco de dados com sequências de vírus (base de dados viral RefSeq) com base em sequências genômicas de vírus do GenBank. Em seguida, os *contigs* gerados foram contrastados contra a base de dados viral RefSeq. Com auxílio do programa *Blastx* (*Basic LocalnngsAlignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990; 1997) os *contigs* que obtiveram *hits* com vírus de plantas foram analisados e comparados com o auxílio do programa Geneious “*de novo*” (Geneious version 7.1 - Kearse et al., 2012).

4.3.2 Anotação do genoma viral

Os genomas de vírus de planta foram montados pelo programa *de novo* Geneious (Geneious version 7.1- Kearse et al., 2012). Uma vez o genoma montado foi realizada a etapa de predição gênica. As abordagens para predição de genes foram “baseadas em evidências”, utilizando-se buscas para identificar genes semelhantes já observados anteriormente. Os possíveis genes foram submetidos ao programa *blastx* (Altschul et al., 1990; 1997) e comparados com sequências homólogas aos genomas de referência (Geneious version 7.1 - Kearse et al., 2012) e só então anotados.

4.3.3 Análise da distribuição de diversidade dos genomas

A frequência de polimorfismo de troca de uma base na sequência do DNA - SNP (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) foi classificando de acordo com as substituições observadas (sinônimas e não sinônimas). Logo, para realização dessa classificação o presente trabalho utilizou o programa Geneious (Geneious version 7.1 - Kearse et al., 2012). Os *reads* obtidos pela a plataforma Illumina (Illumina HiSeq 2000) foram mapeados no genoma de cada um dos virus analisados, determinado o número total de SNPs e se eram sinônimos ou não sinônimos. A detecção de polimorfismos foi realizada com os seguintes criterios: (i) cobertura minima de 300 x, isto é, cobertura mínima de 30 *reads*; (ii) frequência minima de 3 e 10% e (iii) vies de fita (3' e 5') de no máximo 65%.

4.3.4 Análise filogenética

A comparação de sequências é uma operação muito importante para a análise de sequências biológicas. Comparar sequências significa encontrar quais partes destas são parecidas e quais são diferentes. Estas diferenças são determinadas fazendo o alinhamento das mesmas. Esse trabalho realizou alinhamentos múltiplos de sequências deduzidas dos diferentes genomas (ou genes) depositadas no GenBank, que foram construídos utilizando o algoritmo MAFFT (Kato et al., 2002). As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de Máxima verossimilhança implementada no programa PhyML (Guindon et al., 2003). A edição de cada árvore confeccionada foi pelo programa FigTree (FigTree v1.4.1).

4.4 Extração de RNAs

4.4.1 Extração de RNA total

A partir de folhas de plantas com sintomas de virose, utilizando 3 discos de folha (diâmetro 0,5 cm) foi realizada a extração do RNA total com o produto comercial Trizol (Manual Bac-To-Bac Baculovirus). Seguindo as orientações do fabricante. Alíquotas do RNA extraídos foram desnaturados por 10 minutos a 65 °C e em seguida mantida em gelo por 5 minutos. Posteriormente, produtos das extrações foram aplicados em gel de agarose 1% e resolvido por eletroforese para verificar a qualidade do RNA extraído (Sambrook et al., 2001).

4.4.2 Montagem do ensaio e extração de dsRNA em plantas assintomáticas

As sementes de melancia das cultivares Manchester e Top Gun foram germinadas em gerbox (caixa plástica 15x7x2 cm) com papel filtro (autoclavado), umedecido em água (autoclavada) e mantida a temperatura de 28 °C, por sete dias. Após a germinação, as plantas foram transferidas para vasos (0,5 L) contendo substrato (BioPlant – CE:0,6-1,4) e terra (autoclavada) na concentração 1:1 (terra : substrato). As mudas de melancia (sem inoculação) foram cultivadas em câmara de aclimação controlada (Fitotron - WEISS TECHNIK- SGC120 – AL) a condições a temperaturas de 18 °C, com 8 h de luminosidade, 23 °C com 16 h sem luminosidade e 70 % de umidade.

Para a extração do dsRNA foram utilizados três protocolos de extração com modificações a fim de se obter maior concentração de material extraído (Dodds et

al., 1984; Tzanetakis et al., 2008; Valverde 1990 com modificações).

Foram maceradas em nitrogênio líquido 10, 20 e 100 g de folhas de plantas por cultivar (30 a 40 dias após a germinação) e, em seguida, transferido para tubos de 50 mL com tampa (Falcon). Nas amostras trituradas (10 g) foram adicionadas 1 mL de SDS 10 %, 1 mL de 2 % Bentonite (Sigma), 10 mL de 1 X STE (0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 6.9), 10 mL de fenol saturado com 1 X STE e 5 mL clorofórmico. As amostras foram misturadas sobre o gelo, por 30 min em agitador, depois submetida a centrifugação a 8.000 x g por 20 min (centrífuga preparativa – Beckman/ J2-MI – USA. Rotor SW-14). A fase aquosa foi transferida para tubos de centrífuga de 50 mL (falcon) e adicionado 100 % etanol (2,5 X o volume da fase aquosa). As amostras foram estocadas por 12 h (*overnight*) a 4 °C.

A coluna de celulose CF-11 (Celulose Fibrosa – Whatman) foi preparada com 1 g de resina e saturada com 5 mL de tampão de extração (1XSTE - ethanol 16 %) e depositada em seringa plástica de 20 mL. Todo o volume obtido do extrato vegetal foi filtrado, passando pela coluna (celulose). A coluna foi lavada com 60 mL de 1 X STE contendo etanol (16 %). O dsRNA foi eluído em tampão 1 X STE e precipitado com adição de 0.5 µl de acetato de sódio [3 M] (pH 5.5) e 20 mL de etanol 100 % na amostra.

O dsRNA foi estocado a -20 °C por 12 h (*overnight*). O precipitado de dsRNAs foi coletado pela centrifugação de 8.000 x g por 25 min. O sedimento (*pellet*) depois de seco foi eluído em 200 µL TBE 1 X (Tris, Boric Acid, EDTA). Nas amostras foram adicionadas 30 µL de acetato de sódio [3 M]; 0.9 ml etanol (96 %) e incubadas a -20 °C por 12 h (*overnight*). Depois, os tubos foram centrifugados a 6000 x g por 20 min, o sedimento foi eluído em H₂O MilliQ estéril (*RNase free*). As amostras foram tratadas com DNase - Promega RQ1 - DNase [2 U / µL], Cl Mg₂ [10 µg/µl + 600 mM Cl Mg₂] e RNase A (Promega). Em seguida, analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (*RNase free*) (Sambrook et al., 2001).

4.5 Detecção por PCR

Os vírus foram identificados utilizando a técnica de Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR, na sigla em inglês). Para o RT dos segmentos de tospovírus foram utilizados os oligonucleotídeos específicos antisense: GRSV segmento S (GRSV-S For/Rev), segmento M (GRSV-MFor/Rev) e do segmento L (GRSV-LFor/Rev). Para o gênero *Potyvirus*, para ambos os vírus PRSV e ZYMV, a

identificação foi realizada com oligonucleotídeos universal, a partir dos oligoDT- T17 M10 antisenso (T₁₇ -3') (adaptado, Chen et al., 2001). Para os genomas identificados no presente trabalho foram construídos oligonucleotídeos específicos, sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies), descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Combinações de oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR, para construção da biblioteca de cDNA, com base nos genomas detectados por NGS: GRSV; potivírus (degenerado); PRSV-TO; ZYMV-TO e partitivírus

Vírus	Nome e sequência Senso (F) 5'-3'	Nome e sequência Antisenso (R) 5'-3'	Temperatura anelamento °C	Fragmento Esperado - pb
<i>Tospovirus</i>				
GRSV				
Segmento S (Almeida, et al., 2014)	GRSV-S For - CTG TCA	GRSV-S Rev - CTT GAC	55	636
	GGA AAA TCT TGA CCT	TCC AAA CAT CTC GT		
	*GRSV-M_For	*GRSV-M_Rev	55	504
Segmento M	*GRSV-L_For	*GRSV-L_Rev	55	505
<i>Potyvirus</i>				
(Adaptado de Chen et al., 2001)	-	T17 M10 AAGCAGTGTATCAACGC	55	1.7
	PY11	AGA M10		
	GGNAAYAAAYAGYGGNC ARCC	AAGCAGTGTATCAACGC AGA	55	
<i>Potyvirus</i>				
PRSV/TO	PRSV_TO/F, AAAGGCTCAGGAGGAC ATGT	PRSV_TO/R GAGAGGAGACTCACCCGA AT	58	524
ZYMV/TO	ZYMV_TO/F TCTCTGGTTTATGTCCCA CC	ZYMV_TO/R GCCTCTGGTTCAACCAA GT	58	702
<i>Deltapartitiviruss</i>				
CiLPV 1 (RdRp)	P-1865-F AGCAGTCTCAATGGCAT	P-1865-R TCGTGACCATCCAGAAAG	60	490
	GCT	GC		
CiLPV 2 (CP)	P-1214-F AGGTCAAATTGATGCCA GCA	P-1214-R GAGCTCAGGACACTTCAT GG	60	675

* Oligonucleotídeos para os segmentos M e L de *Tospovirus*, fornecido por Almeida, M.S.M (dados não publicados)

4.5.1. Construção de oligonucleotídeos específicos

Para detecção de PRSV e ZYMV foram construídos dois pares de oligonucleotídeos a partir de sequências de nucleotídeos obtidas por NGS no presente trabalho. Estes oligonucleotídeos foram denominados PRSV_TO/F, PRSV_TO/R (Figura 12), que amplifica (via PCR) um fragmento de 524 pb e ZYMV_TO/F, ZYMV_TO/R (Figura 13), que amplifica (via PCR) um fragmento de 702 pb.

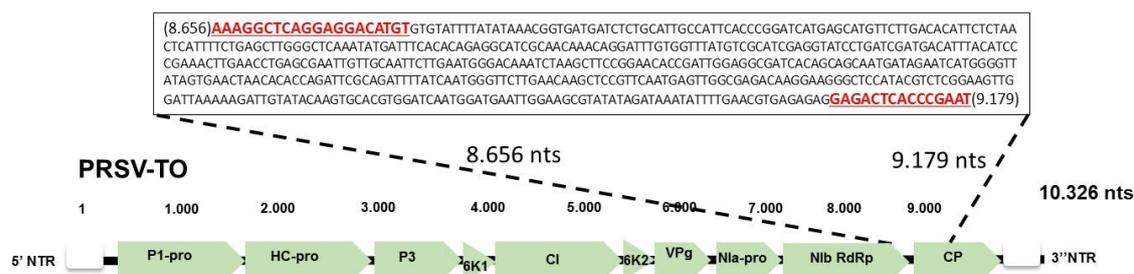


Figura 12: Diagrama do genoma do PRSV, mostrando as diferentes ORFs e as posições dos oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento de ~ 524 pb específico para o PRSV-TO.

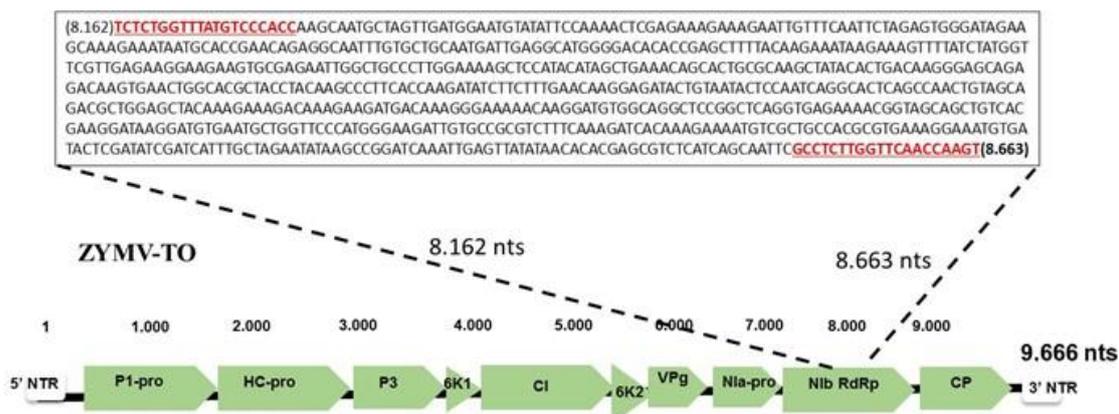


Figura 13: Diagrama do genoma do ZYMV-TO, mostrando as diferentes ORFs e as posições dos oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento de ~ 702 pb, específico para o ZYMV-TO.

Para detecção do representante do gênero *Deltapartitivirus* foram construídos dois pares de oligonucleotídeos a partir de sequências de nucleotídeos obtidas no presente trabalho por NGS (RNA1 e RNA2). Estes oligonucleotídeos foram denominados P-1865-F, P-1865-R, que amplifica (via PCR) um fragmento com cerca de 490 pb (Figura 14) e P-1214-F, P-1214-R, que amplifica (via PCR) um fragmento com cerca de 675 pb (Figura 15).

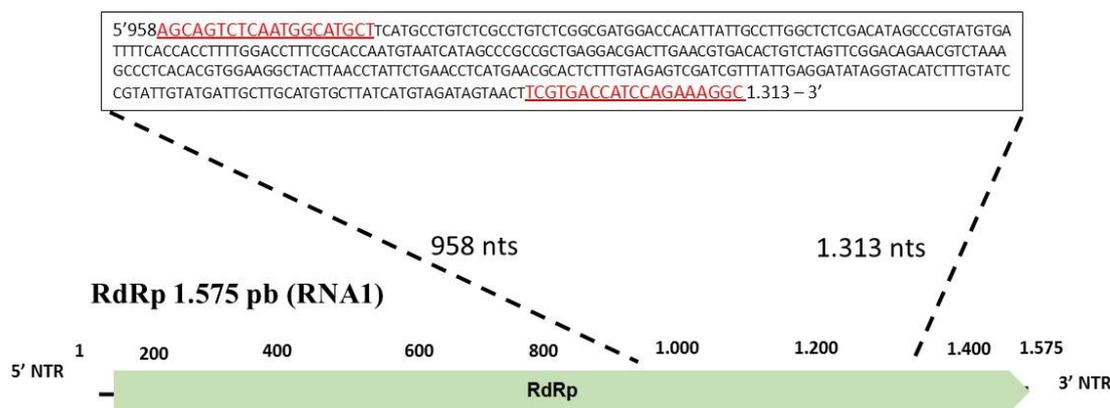


Figura 14: Diagrama do RNA1 do vírus CiLPV-TO mostrando a ORF da RNA Polimerase e as posições dos oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento de ~400 pb, específico para o CiLPV-TO.

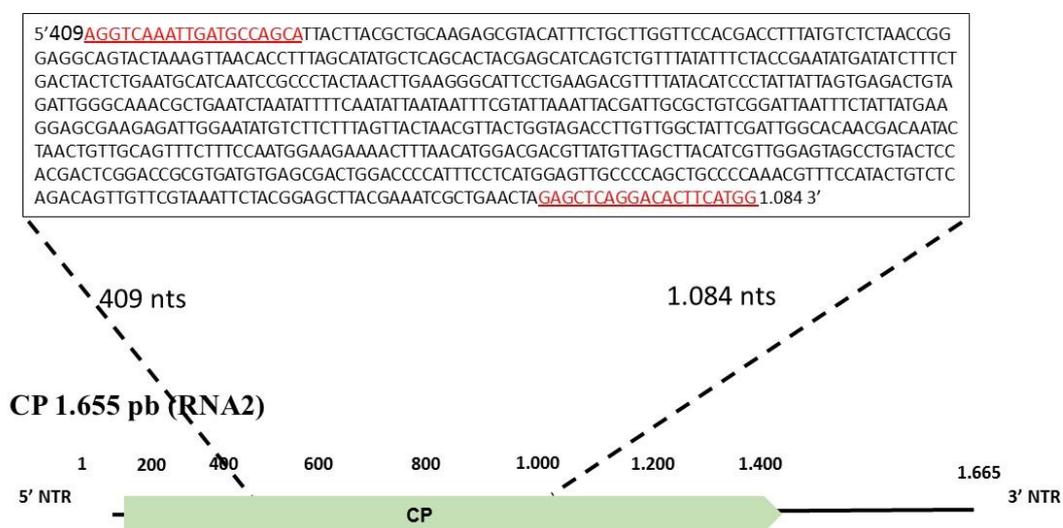


Figura 15: Diagrama do RNA2 do vírus CiLPV-TO mostrando a ORF da Capa Protéica (CP) e as posições dos oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento de ~675 pb, específico para o CiLPV-TO.

4.5.2 RT-PCR

A transcrição reversa foi realizada com as enzimas SuperScript II (Invitrogen) e M-MLV (Promega); RNase (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor-Invitrogen), o RNA total como molde (20 ng / μ L) em um volume final de 25 μ L. A reação de transcrição foi realizada em uma temperatura de acordo protocolo da enzima transcriptase reversa (42 °C ou 65 °C) por 1 h. Em seguida, esta reação foi submetida a incubação a 70 °C por 15 min para inativação da ação enzimática (segundo o protocolo do fabricante).

O cDNA foi amplificado por PCR, empregando diferentes combinações de oligonucleotídeos (Tabela 4). Utilizou-se a enzima *Platinum Taq* (DNA polymerase high Fidelity - invitrogen) no volume final de 25 μ L (segundo o protocolo do fabricante).

As reações da PCR foram realizadas com o programa de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, tempo e temperatura de anelamento específica para cada par de oligonucleotídeos, de acordo com o tamanho do fragmento (Tabela 4) 72 °C e 1 ciclo de 5 min para extensão final. A amplificação do cDNA foi resolvida por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.6 Confirmação por clonagem e sequenciamento (Sanger)

O produto obtido por RT-PCR foi extraído do gel e purificado com kit da GE (GE PCR purification kit GE, USA). O produto purificado foi ligado ao vetor pGEM T easy (3 : 1) com 0,3 U da enzima T4 DNA Ligase (Promega®), tampão específico da enzima diluído 10x e água Milli-Q, para um volume final de 10 µL. Essa reação ficou 12 horas a 4° C. Em seguida, foi transformado (Sambrook et al., 2001) em células de *E.coli* DH10B (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells-Invitrogen™) com o aparelho eletroporador Bio-Rad MicroPulser™, segundo instruções do fabricante. As células de *E. coli* eletroporadas foram semeadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, em meio de cultura sólido LBroth (Affymetrix-20 g / L) com Agar (Invitrogen-20 g / L) contendo ampicilina (concentração de 100 µg / mL), X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indol-β- D-galactoside) a 2 %, IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) a 100 mM e incubadas a 37 °C por 12 horas.

As colônias contendo plasmídeos recombinantes foram identificadas pela coloração branca, transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 12 horas sob agitação constante de 180 rpm para crescimento bacteriano.

Posteriormente, a extração do DNA plasmidial foi realizada pelo método da lise alcalina em pequena escala (Sambrook *et al.*, 2001). Os plasmídeos extraídos foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Após a extração dos plasmídeos, para confirmação da presença da sequência recombinante, os plasmídeos extraídos foram clivados com *Eco* RI (Promega). O vetor pGEM T easy com o sítio de restrição *Eco*RI, quando digerido por esta enzima o fragmento clonado é liberado e pode ser visualizado em gel de agarose (tamanho em pb esperado), isto é, se o padrão de restrição for confirmado, o clone é positivo. Na reação de clivagem foram utilizados 5,7 µL de água; 1 µL de tampão 10 x (Promega); 2 µL do DNA plasmidial (250 ng / µL); 0,3 µL de *Eco*R I (1U / µL - Promega) e 1 µL de BSA (Bovine Serum Albumin, Acetylated 1µg / µL), em um volume final de 10 µL. Esta

reação foi incubada durante uma hora a 37°C. O padrão de restrição foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Para confirmação dos fragmentos amplificacados e clonados, os clones positivos foram submetidos a purificação com o kit (GE PCR purification kit GE, USA) segundo o protocolo do fabricante. Em seguida, enviados para serem sequenciados pelo método Sanger (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

4.7 Inoculação experimental

As sementes de diferentes cultivares de melancia e plantas hospedeiras foram germinadas em gerbox (caixa plástica 15x7x2 cm) com papel filtro (autoclavado), umedecido em água (autoclavada) e mantida a temperatura de 28 °C, por sete dias. Após a germinação, as plantas foram transferidas para vasos (0,5 L) contendo substrato (BioPlant – CE:0,6-1,4) e terra (autoclavada) na concentração 1:1 (terra:substrato). O experimento foi realizado com quatro repetições e o controle negativo (sem inóculo) para cada cultivar, no total de 24 espécies de plantas hospedeiras (Tabela 5).

Tabela 5: Nome das famílias, espécies, cultivarers e nomes comuns das 24 plantas hospedeiras

Família das plantas hospedeiras	Espécie e cultivar	Nome comum
Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	Quinoa
Amaranthaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Amarantico
Solanaceae	<i>Nicotiana benthamiana</i>	-
Solanaceae	<i>N. rustica</i>	Tabaco
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	Erva daninha
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate
Solanaceae	<i>Capsicum annum</i>	Pimenta
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Manchester	Melancia
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Top Gun	Melancia
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Fayrsax	Melancia
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Crinson-Sweet	Melancia
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Charleston Gray	Melancia
Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i> cv JL dourado	Melão
Cucurbitaceae	<i>C. melo</i> cv Yellow melon	Melão
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> cv SMR8 (hybrid)	Melão
Cucurbitaceae	<i>C. sativus</i> cv Caipira	Melão
Cucurbitaceae	<i>C. sativus</i> cv Magnon	Melão
Cucurbitaceae	<i>C. sativus</i> cv Wyscosir	Melão
Cucurbitaceae	<i>C. sativus</i> cv Carplra	Melão
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i> cv Marantira	Abóbora
Cucurbitaceae	<i>C. pepo</i> cv Brasileira	Abobrinha
Cucurbitaceae	<i>C. pepo</i> cv Caserta	Abobrinha
Cucurbitaceae	<i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i> hybrid cv Cabotiá	Cabotiá
Cucurbitaceae	<i>C. moschata</i> cv Jacarezinho	Abóbora

As folhas das plantas de melancia infectadas (*pool* de inóculo inicial de campo) foram maceradas em tampão de inoculação (fosfato de sódio monobásico 0,01 M e sulfato de sódio 0,001 M, pH 7,0). A inoculação foi realizada nas plantas mantidas em casa de vegetação (total de 120 com o controle negativo), com fricção do dedo com luvas, umedecido no macerado (inóculo), em folhas do cotilédone (folhas embrionárias), previamente polvilhadas com abrasivo carbureto de sílica (Carborundum - 400 mesh) (de Ávila et al. 1993). Para cada cultivar, uma planta foi usada como controle negativo (tampão (+) abrasivo carbureto), sem inóculo. Posteriormente, as folhas foram lavadas com água para a retirada do excesso de inóculo e abrasivo. O monitoramento dos sintomas foi diário por 30-40 dias.

4.8 Detecção por dot-ELISA em plantas hospedeiras

O dot-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Clark et al., 1977) foi realizada para detecção de GRSV TCSV e TSWV. Contudo, TCSV e TSWV não foram identificados pelo sequenciamento por NGS, mas a fim de corroborar com o resultado obtido no presente trabalho foi realizado dot-ELISA para esses vírus. O extrato foi preparado em tampão fosfato, pH 7,0 (2.7.2) na proporção de 1:10 (p:v) com folhas das plantas inoculadas da gama de hospedeira; plantas infectadas com vírus (controle positivo) e plantas de melancia do inóculo de campo (inóculo inicial). Foram utilizados antissoro policlonais produzidos contra a capa protéica de TCSV e TSWV e GRSV (Laboratório de Virologia Vegetal, UnB– Prof Dr Renato de Oliveira Resende). O dot-ELISA consiste na deposição do extrato da planta diluído (1:100) em tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline* (PBS) na concentração 1 X (NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, e um pH de 7.4), em membrana de nitrocelulose, previamente umedecida no mesmo tampão. As etapas seguintes do procedimento foram conduzidas sob agitação em agitador orbital 80 rpm (Roto Mix – type 48200 – Thermolyne) à temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se a imersão da membrana em solução PBS (1X) contendo 2 % de leite em pó desnatado, por 2 h, para bloquear os sítios da membrana não ocupados pelo antígeno e, em seguida, imersão em antissoro diluído (1:1000) em PBS (1 X) por 12 h. A lavagem da membrana foi realizada três vezes em PBS (1 X), permanecendo nesta solução por cerca de cinco min, em cada lavagem. A incubação da membrana no conjugado universal (Anti-imunoglobulina de coelho produzida em cabra e conjugado à enzima Fosfatase alcalina - Promega) foi realizada na diluição 1:10.000 em PBS (1 X) por 3 h, em seguida foi realizada a lavagem em PBS (1 X). Na revelação, utilizou-se solução de revelação (100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 5 mM MgCl₂ (6H₂O); pH 9,5) contendo BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro azul tetrazólio - Promega) segundo o protocolo do fabricante.

4.9 Detecção por RT-PCR no ensaio de plantas hospedeiras

No ensaio das plantas da gama de hospedeiras, o RNA total foi extraído das folhas apicais de cada planta com 40 dias após a inoculação (descrito no item 4.4). Em seguida, foi realizado RT-PCR com oligonucleotídeos específicos (Tabela 4).

5 Resultados e discussão

5.1 Identificação de vírus

Folhas de melancia (cvs Manchester e Top Gun) foram coletadas em áreas de produção no Estado do Tocantins - Brasil, nos municípios da Lagoa da Confusão, Formoso do Araguaia e Porto Nacional (Figura 16).

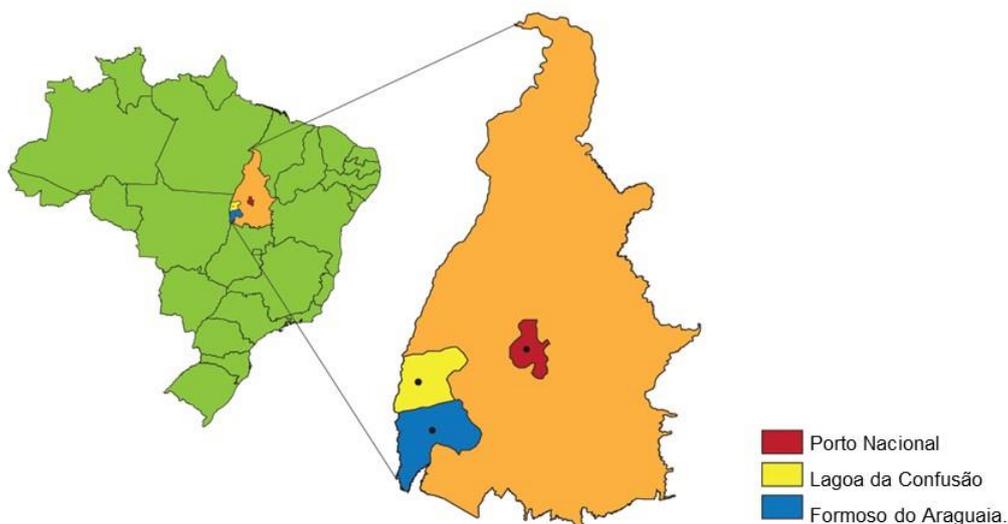


Figura 16: Mapa do Brasil com o estado do Tocantins e os municípios: Porto Nacional (vermelho); Lagoa da Confusão (amarelo) e Formoso do Araguaia (azul). Origem das coletadas de folhas de melancia usadas no sequenciamento por NGS.

A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), pela técnica de imersão foliar usando extratos de folhas de melancia com sintomas característicos. Revelou a presença de infecção por vírus com a presença de partículas alongadas flexuosas ~ 800 nm de comprimento, comparáveis às partículas de potivírus (Figura 17).



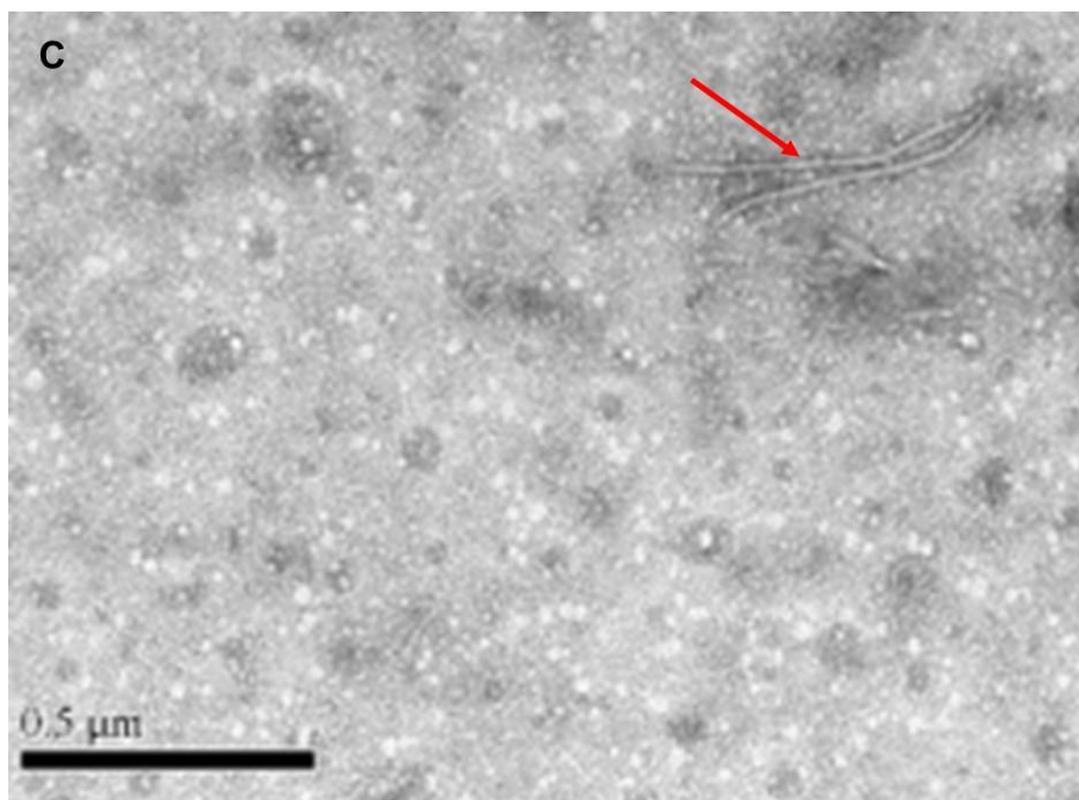


Figura 17: Folhas de melancia da lavoura de Formoso do Araguaia infectada naturalmente e MET. A) As setas indicam mosaico, bolhas e ponto necróticos; B) As setas indicam sintomas deformação folha, mosaico; C) Para análise por MET pela técnica de imersão foliar rápida (“*leaf dip*”) a partir de folhas de melancia infectada naturalmente e com sintomas de virose. A seta indica partículas virais alongadas flexuosas e no canto inferior esquerdo barra de escala (0,5 μm).

5.2 Sequenciamento de análise de RNA

Foram gerados quarenta milhões *reads* (variando entre 15 e 101 nucleotídeos) e após a triagem e/ou limpeza resultou em cinquenta mil *contigs* que foram comparados com o banco de dados de vírus NCBI-GenBank (montado no presente trabalho). Todos os *contigs* foram submetidos a análises *Blastx* contra o banco de dados viral RNASeq, resultando em 4.912 *contigs* com identidade entre sequências públicas de vírus de plantas. Para corroborar com estes resultados os *contigs* selecionados foram contrastados no banco de dados não-redundante GenBank (banco de dados nr) e somente os vírus de plantas foram selecionados e eleitos os que obtiveram sequências maiores que 500 pb com identidade de aa maiores de 90 %. Quatro genomas completos pertencentes as famílias de vírus de plantas *Potyviridae*, *Bunyaviridae* e *Partitiviridae* foram detectadas no presente estudo (Tabela 6).

Tabela 6: Resumo da analogia com genomas de vírus de plantas identificadas por NGS

Genoma (obtido no trabalho)	Acrônimo (denominado no trabalho)	Identidade aa (%)	Número de reads	*Cobertura média	Genoma (nt) (obtido no trabalho)
<i>Groundnut ringspot virus</i> -TO	GRSV-TO S	99	1.936.010	52.211	3.074
	GRSV-TO M	98	713.043	14.042	4.847
	GRSV-TO L	99	1.939.535	22.012	8.876
<i>Papaya ringspot virus</i> , type watermelon-TO	PRSV-W-TO	91,7	1.465.754	14.165	10.326
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> -TO	ZYMV-TO	98,8	1.658.169	17.108	9.666
<i>Citrullus lanatus partitivirus</i> –TO	CiLPV-TO RNA-1 (RdRp)	98	2.982	140	1.575
<i>Citrullus lanatus partitivirus</i> –TO	CiLPV-TO RNA-2 (CP)	93	2.076	98	1.655

*Cobertura média: quantidade em média de reads gerado pelo sequenciamento (NGS) ao longo do genoma.

5.3 Tospovírus - GRSV

Os resultados revelaram um total de 4.585.588 *reads* distribuídos aos três segmentos correspondendo ao genoma de GRSV. Na estrutura proposta para o genoma do possível vírus *Groundnut ringspot virus*-GRSV, foram identificadas as regiões intergênicas (RI), dos segmentos S e M, e as sequências conservadas de oitos nucleotídeos presentes nas extremidades: 5' NTR (AGACGAAU) e 3' NTR (UCUGCUUA) das ribonucleoproteínas (RNP) (Kormelink et al., 2011). No entanto, no segmento M apenas seis nucleotídeos foram identificados, provavelmente devido ao sequenciamento de baixa qualidade e/ou baixa cobertura na extremidade 5' NTR.

O segmento RNA S de 3.074 pb codifica a proteína não estrutural (NSs) direção senso e a proteína do nucleocapsídeo (N) no sentido antisenso, com uma região intergênica (RI) de 655 nts (1.442 - 2.146) formada com 32% de adenina e 42% uracila. O segmento RNA M de 4.847 pb, codifica a proteína não estrutural (NSm) no sentido senso, e a glicoproteína (G_N / G_C) no sentido antisenso, com uma RI de 353 nts (1.004 - 1.356) formada com 39 % de adenina e 34,5 % de uracila. As RI (S e M) apresentaram predominantemente os nucleotídeos adenina e uracila e é responsável pela formação de uma estrutura denominada de *hairpin* (formato de um grampo), com função no processo da regulação da transcrição e da replicação (Fauquet et al., 2005).

O segmento RNA L de 8.876 pb codifica uma proteína L (RdRp) na orientação antisenso (senso negativo) com única fase de leitura aberta (ORF) (de Haan et al., 1991). A proteína L participa de processos enzimáticos, como polimerase e endonuclease e na transcrição e replicação viral (Adkins et al., 1995; Chapman et al., 2003).

Os segmentos virais foram alinhados com 9 sequências nts de tospovírus depositadas no banco de dados (GenBank) e então, realizada a montagem e anotação do genoma (Figura 18).

O genoma GRSV identificado no presente estudo foi denominado GRSV-TO.

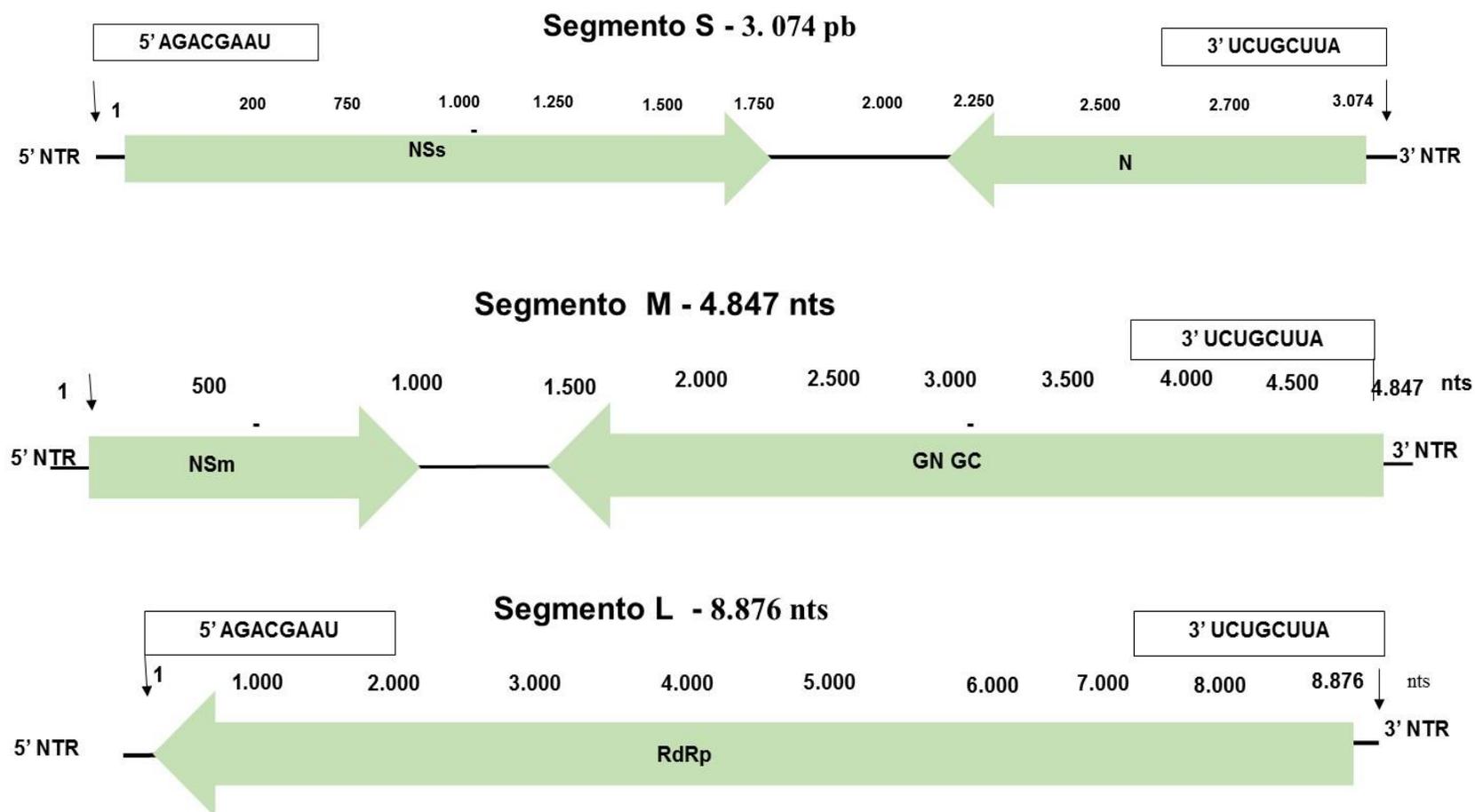


Figura 18: Diagrama do genoma de tospovírus. Diagrama representativo para o genoma de GRSV-TO dos três segmentos (S, M e L) montado e anotado pelo programa Geneious, evidenciando as sequências conservadas para este gênero nas extremidades 5'-3' NTR (caixa), regiões intergênicas (RI) e o tamanho das sequências em nts dos genomas.

Outro topovírus, o ZLCV, já foi relatado causando infecção em campos de produção de melancia, inclusível no Estado do Tocantins, Brasil (Aguiar et al., 2014). Entretanto, este vírus não foi identificado no presente trabalho, possivelmente pela diferente técnica utilizada para a diagnose (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) e/ou progresso temporal e espacial de epidemias. Em cultivo conduzido em casa de vegetação foi identificado importante representante do gênero *Tospovirus*, o vírus GRSV causando infecção em frutos de pepino (*Cucumis sativus*) (Spadotti et al., 2014). Nos campos de produção de melancia do Estado de São Paulo, Brasil, folhas de melancia foram observadas com infecção natural por GRSV e dois isolados (nº de acesso no GenBank = KJ183076 / KJ183077) foram sequenciados a partir do segmento S (N) (Leão et al., 2015). Os isolados apresentaram 99,3 % de identidade nts (278 nts de S), com sequência nts do segmento S de GRSV-TO. Este resultado corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, para a montagem e anotação do primeiro genoma completo do vírus GRSV (S, M e L).

5.3.1 Distribuição e a frequência de SNPs

A distribuição de SNPs no genoma completo de GRSV-TO com todos os segmentos (S, M e L) foi realizada com uma frequência de 10%. Uma vez que, o recomendado na literatura seja frequência mínima variante de 1 % para análise de SNPs (Lauck et al., 2012). A porcentagem utilizada de 10% foi visando eliminar qualquer falso SNPs com inserção e deleção de nucleotídeos na região polimórfica (possíveis erros do sequenciamento por NGS).

No segmento S os polimorfismos analisados foram no total 144 SNPs. Na proteína NSs foram 94 polimorfismos, sendo que 75 foram sSNP (sinônima) e 19 nsSNPs (não sinônima). Na proteína N foram 50 polimorfismos, sendo que 44 foram sSNP e 6 nsSNPs.

No segmento M os polimorfismos analisados foram de 442 SNPs. Na proteína NSm foram 74 polimorfismos, sendo que 60 foram sSNP e 14 nsSNPs. Na proteína GN/GC foram 368 polimorfismos, sendo que 298 foram sSNP e 70 nsSNPs.

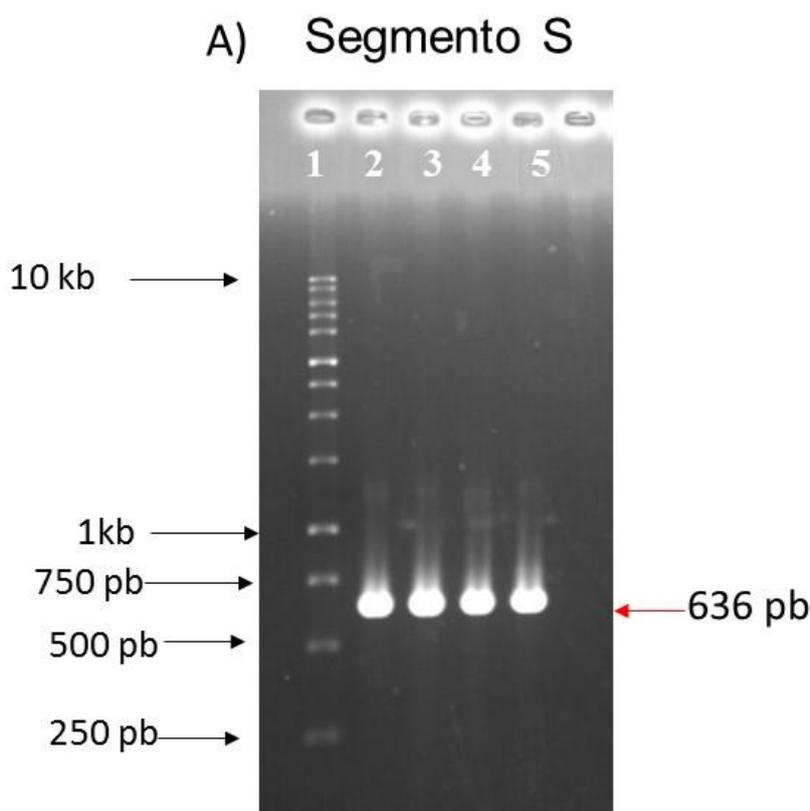
No segmento L os polimorfismos analisados foram de 1.028 SNPs, sendo que 937 foram sSNP e 91 nsSNPs.

A análise revelou que os segmentos S e L são mais conservados, com apenas 25 e 41 nsSNP, respectivamente. Resultado esperado, pois, a proteína N, codificada pelo

segmento S, é usada na classificação taxonômica do gênero *Tospovirus* (de Avila et al., 1993; King et al., 2011). Estudos anteriores revelam que o segmento L possui domínios conservados (Chapman et al., 2003).

5.3.2 Confirmação do GRSV-TO no inóculo inicial por RT-PCR

Dada a importância da confirmação dos vírus identificados por NGS, foram realizadas RT-PCRs com oligonucleotídeos específicos (Tabela 4), usando como molde os RNAs totais extraídos das folhas infectadas das três amostras das regiões (Lagoa da Confusão – LC; Formoso do Araguaia – F e Porto Nacional - PN). Na Figura 19 A, B e C, pode-se notar claramente a amplificação dos fragmentos de aproximadamente 636, 504 e 490 pb, com os oligonucleotídeos específicos para os três segmentos (S, M e L), respectivamente. Os fragmentos obtidos foram confirmados por sequenciamento pelo método Sanger.



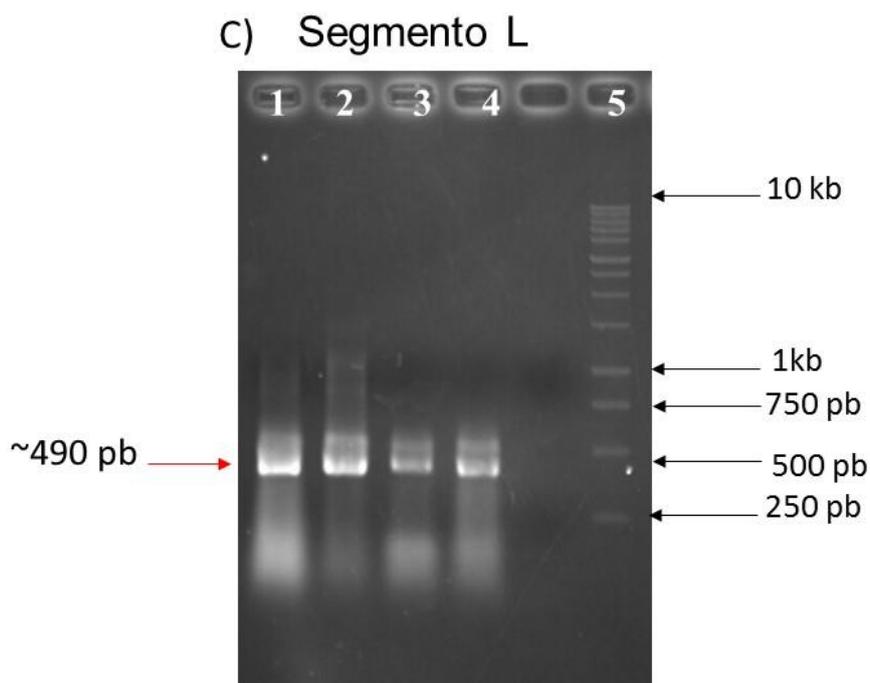
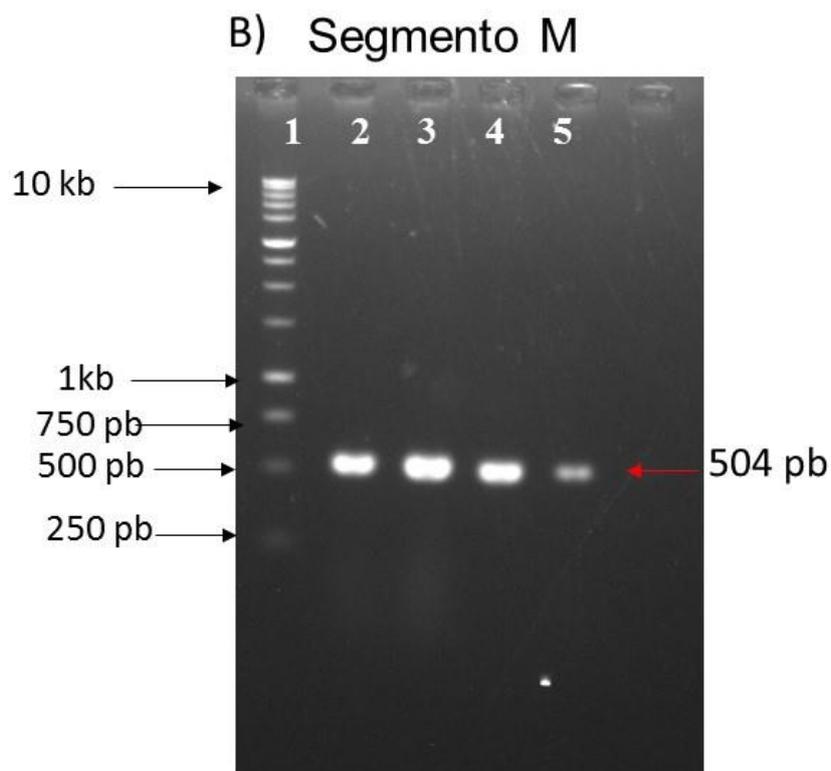
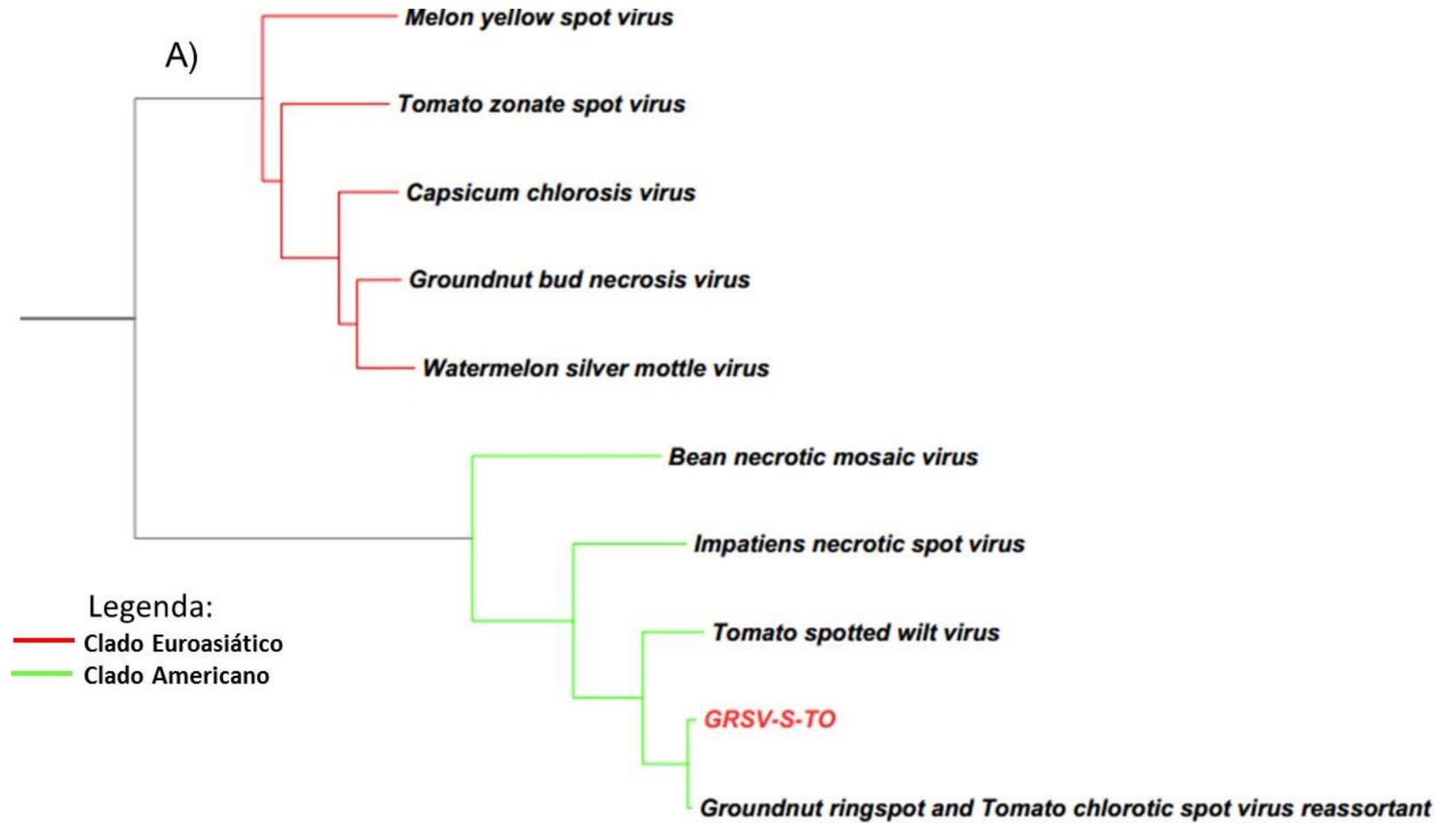
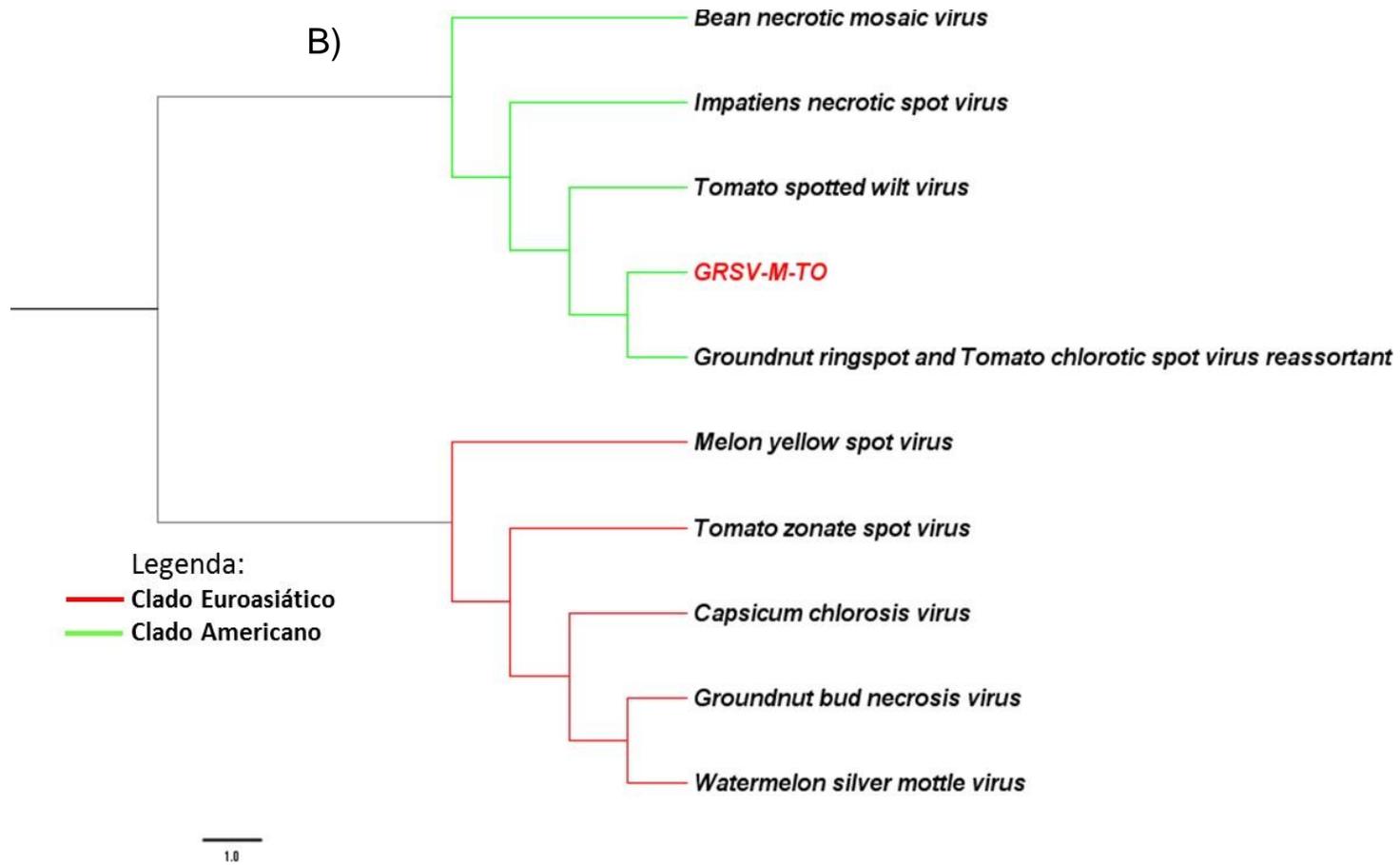


Figura 19: RT-PCR com oligonucleotídeos, para os três segmentos GRSV. Amplificação a partir do RNA total do inóculo inicial dos municípios Lagoa da Confusão (LC); Formoso do Araguaia (F) e Porto Nacional (PN). A) segmento S (636 pb) e B) segmento M (504 pb): 1- Marcador 1 kb ladder (Pomega); 2- controle positivo: *Tomato spotted wilt virus*; 3- F; 4- L C; 5- PN. C) segmento L (490 pb): 1- controle positivo: *Tomato spotted wilt virus*; 2- F; 3- L C; 4- PN e 5- Marcador 1 kb ladder (Promega).

5.3.3 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada entre os segmentos do isolado GRSV-TO (S, M e L) e sequências nts de nove isolados geográficos de tospovírus (Tabela A1 nº acesso GenBank -Anexo do capítulo I). Observou-se claramente a divisão em clado euroasiático em vermelho e americano em verde (Figura 20).





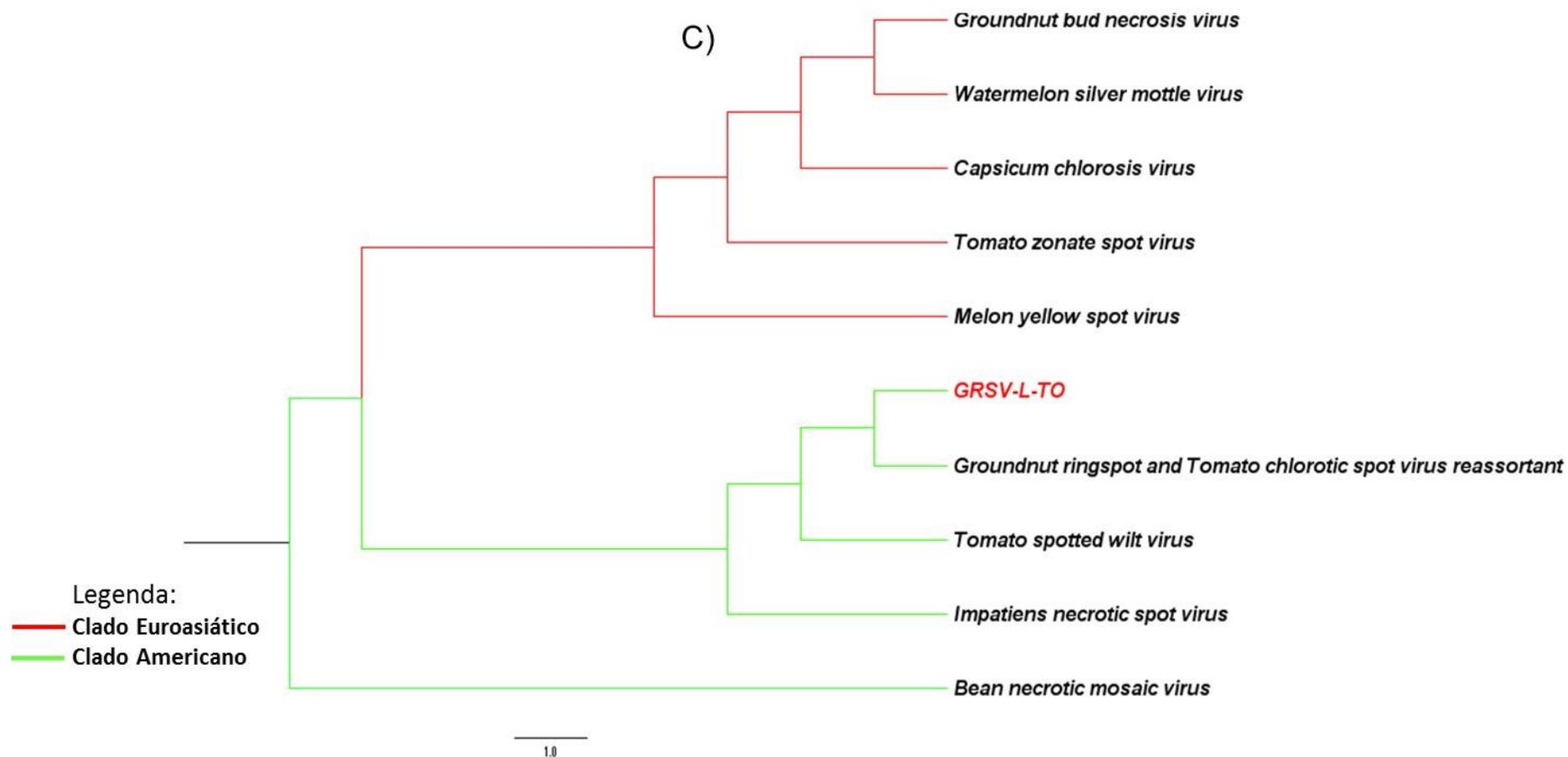


Figura 20: Análise filogenética dos (S, M e L) das proteínas codificadas do GRSV. A análise filogenética foi realizada entre GRSV-TO (letra vermelha) e nove sequências nucleotídicas de isolados geográficos de cada segmento. A) Árvore construída a partir de sequências do segmento S; B) Árvore construída a partir de sequências do segmento M; C) Árvore construída a partir de sequências do segmento L. Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, programa PhyML 3.0. A barra na parte inferior do lado esquerdo mostra o número de substituições/sítio. As árvores foram enraizadas por *midpoint* (Tabela A1 nº acesso GenBank -Anexo do capítulo I).

No clado americano as análises de *pairwise* (par-a-par) para o segmento S entre de GRSV-TO obteve maior identidade de aminoácido (96, 1%) com o GRSV / TCSV *reassortant* (NC_015467). Este isolado foi relatado por Webster et al. (2011) e possui um rearranjo (*reassortant*) genômico, formado do genótipo dos segmentos S e L de GRSV e o M do TCSV. No clado eurasiático, a menor identidade de nts foi com o isolado WSMoV (NC_003843) com 39, 2% e os demais isolados variaram de 42,8 – 41,5 % e todos os ramos apresentaram origem no mesmo nó. Ao comparar os outros segmentos foram obtidos resultados bem semelhantes, para o segmento M no clado americano 90,6 – 45,5% e eurasiático 45,3 - 43,8 %. O clado americano para o segmento L, a maior identidade foi entre o GRSV / TCSV (*reassortant*) com 97, 4 % e TSWV (NC_002052) com 76,9%.

Nas três árvores nota-se claramente a permanência do isolado GRSV-TO no mesmo clado que GRSV / TCSV (*reassortant*), que provavelmente possuem ancestral comum quando observado o nó mais interno do TSWV (Figura 20).

5.4 Potivírus

5.4.1 PRSV

Os resultados revelam um total de 1.465.768 *reads* correspondendo ao genoma de PRSV. Após sua análise no programa *Blastx* foram observados *hits* de sequências nucleotídicas conservadas da família *Potyviridae*, de PRSV (Adams et al., 2005). O genoma predito de PRSV obtido no presente estudo foi denominado de PRSV-TO, com uma sequência completa de um fragmento de 10.326 pb, correspondente a poliproteína. Para anotação e montagem do genoma foram deduzidos os sítios de clivagem da poliproteína e os resultados das sequências (aa) de PRSV-TO foram submetidas ao alinhamento com as sequências de espécies do gênero *Potyvirus*, comparadas e analisadas por toda a região do genoma (Figura 21). A CP é mais representativa em critérios taxonômicos, com a grande disponibilidade de sequências. (Antreya et al., 1990; Adams et al., 2005).

Transmissão do vírus por um vetor é muitas vezes caracterizado por especificidade (Andret-Link et al., 2005). A análise do isolados PRSV-TO identificou a presença de motivos conservados com os aa DAG (destacado na Figura 21) na CP (9,276 - 9,282), potencialmente associados com a transmissibilidade por afídio (Atreya et al., 1991; 1995). Também foram observadas logo após o motivo DAG, um trecho com repetições de ácido glutâmico e lisina (E K) na extremidade CP do PRSV-TO.

Com base nas análises das sequências conservadas dos sítios de clivagem, a partir de estudos anteriores (Adams et al. 2005; 2015) foram preditas dez proteínas maduras (P1, HC-Pro, P3, 6k1, CI, 6k2, NIa-VPg, NIa-pro, NIB e CP) produzidas a partir da poliproteína. A análise da poliproteína, na junção entre as proteínas, estão previstas na Tabela 7. As proteinases virais dos potyvírus são altamente específicas, tendo locais rigorosos de clivagem. Como esperado não houve alteração nos resíduos para PRSV-TO, quando comparados com os vírus já descritos para a espécie.

Tabela 7: Identificação dos possíveis sítio de clivagem da poliproteína do vírus PRSV-TO com ligação dos dez peptídeos maduros, os números indicando a posição na sequência (aa) e número de vírus da mesma espécie descrita por Adams et al. (2012).

Proteínas	Sítio de clivagem de aa PRSV	Total Nº de vírus PRSV
P1 / HC-Pro	MEQY ₉₁ /N ₁₇₃₇	7
HC-Pro /P3	YIVG ₁₇₃₇ /G ₃₁₀₉	26
P3/6K1	VYHK ₃₁₀₉ /A ₄₁₅₆	27
6K1/ CI	VYHQ ₄₁₅₆ /S ₄₃₁₂	27
CI /6K2	VYHQ ₄₃₁₂ /S ₆₂₁₇	22
6K2/ VPg	VFHQ ₆₂₁₇ /G ₆₃₈₈	25
VPg/ Nia	VHHE ₆₃₈₈ /G ₆₉₅₅	249
NIa/ Nib	VFEQ ₆₉₅₅ /S ₇₆₆₉	34
Nib/ CP	VFHQ ₇₆₆₉ /S ₉₂₈₀	209

5.4.1.1 Distribuição e a frequência de SNPs

No presente trabalho foi adotado frequência de SNPs de 3 e 10%, como margem de segurança, na tentativa de eliminação de possíveis erros produzido pelo sequenciamento por NGS, como inserção e deleção de nucleotídeos em região polimórfica.

A distribuição da frequência com de 3 %, mostra a presença de 78 polimorfismos. Os polimorfismos detectados na sequência nucleotídica do isolado PRSV-TO 74,4% foram polimorfismos sem alteração na sequência deduzida de aminoácido (sSNP) e 25,6% os polimorfismos que causaram variações (nsSNPs). A P1_(81 – 1.726) é a primeira proteína madura e a mais variável no genoma de todos os *Potyvirus* (Adams et al., 2005), portanto, apresentou maior número de variações totalizando a presença de 17 bases polimórficas, com sete nsSNP. A frequência com 10% obteve 3 polimorfismos (Tabela: 8).

Tabela 8: Resultados de nsSNP baseado nas frequências de variação entre 3 e 10% entre os reads gerados por NGS para o PRSV-TO

Proteínas	sSNP (74,4%)	nsSNPs (25,6%)	sSNP (85 %)	nsSNPs (15 %)
	3%		10%	
P1	10	7	2	1
HC-Pro	7	2	-	-
P3	5	6	2	-
6K1	-	-	-	-
CI	7	1	2	1
6K2	-	-	-	-
Na1VPg	3	1	2	1
Nia	2	-	2	-
NIb	5	1	2	1
CP	19	1	17	1

(-) não foi detectado polimorfismo

5.4.1.2 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada entre o isolado PRSV-TO e 27 sequências de nucleotídeos dos genomas completos de PRSV (Tabela A1 -Anexo do capítulo I). Observou-se no clado da América do Norte (México, EUA e um isolado da França), que os acessos dos EUA e França (KC345609) tiveram origem a partir do isolados do México e provavelmente compartilhem o mesmo ancestral. Este isolado francês está sendo proposto como uma nova espécie potyvírus, *Zucchini mosaic tigre virus* (ZMVT) (Romay et al., 2014), entretanto, os isolados brasileiros com o PRSV-TO em vermelho ficaram em clados distintos, apesar de possivelmente compartilharem o ancestral comum (Índia). A origem evolucionária do vírus, provavelmente tenha sido na Ásia (Figura 22).

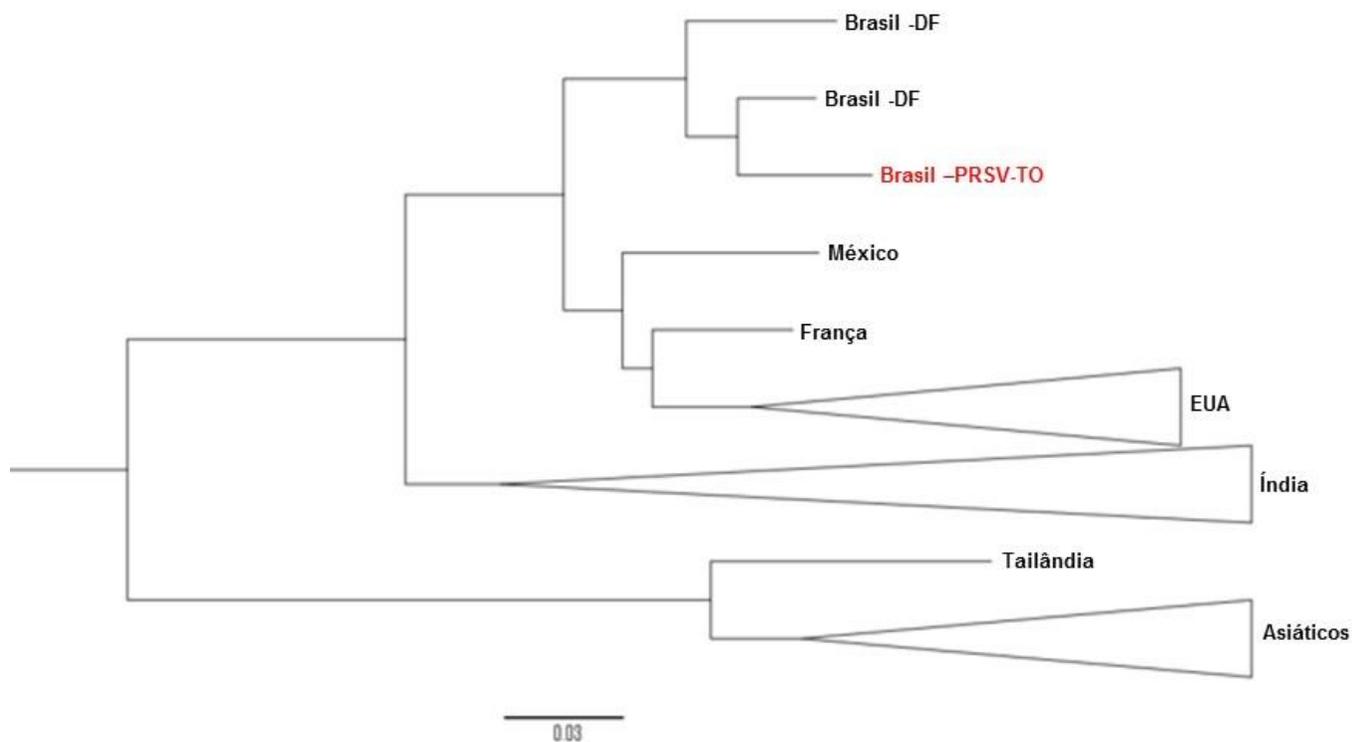


Figura 22: Análise filogenética PRSV-TO. Árvore filogenética mostrando o PRSV-TO e 27 sequências nucleotídicas completas do genoma viral de PRSV. Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, programa PhyML 3.0. A barra na parte inferior do lado esquerdo mostra o número de substituições/sítio. A árvore foi enraizada por *midpoint* (Tabela A1 - Anexo do capítulo I). Alguns ramos foram colapsados para uma melhor visualização.

A análise filogenética entre o isolado PRSV-TO e 631 sequências de nucleotídeos codificadora da CP dos isolados disponíveis no banco de dados (Tabela A1 - Anexo do capítulo I) apresentaram heterogeneidade com isolados geográficos de diferentes partes do mundo na formação dos clados (Figura: 23).

Na análise entre os isolados do Brasil, destaca-se o isolado PRSV-TO (vermelho) no mesmo clado um isolado cubano (KC768854). Rodríguez-Martínez et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes com a análise filogenética, que formaram um grupo (Americano e Australiano) e outro grupo com isolados de Cuba (PRSV-W) e do Brasil, portanto, possivelmente a entrada do vírus em Cuba tenha origem em isolados brasileiros (Figura: 23).

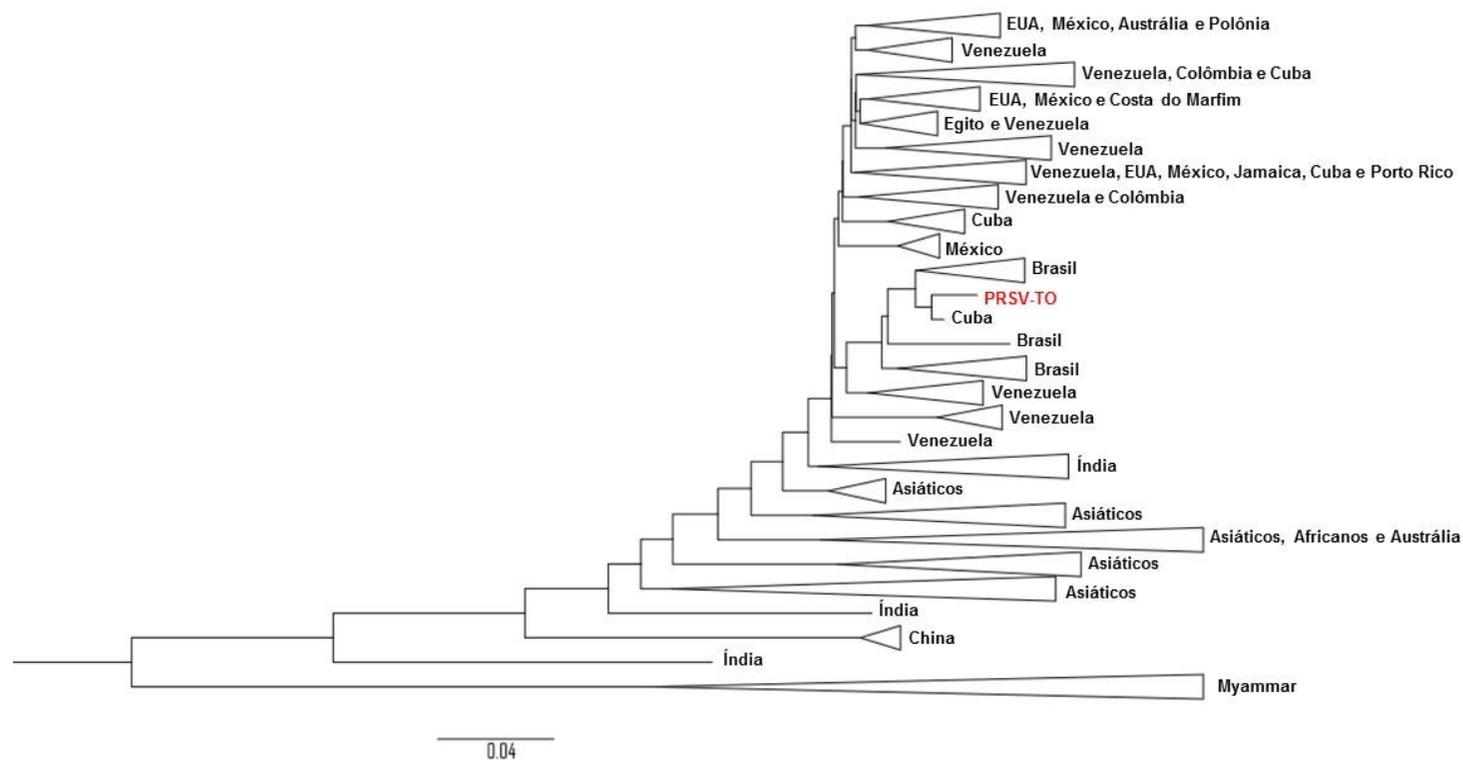


Figura 23 Análise filogenética do PRSV-TO (CP). Árvore filogenética mostrando o PRSV-TO (CP) e 631 sequências nucleotídicas da CP (PRSV). Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, programa PhyML 3.0. A barra na parte inferior do lado esquerdo mostra o número de substituições/sítio. A árvore foi enraizada por *midpoint* (Tabela A1 -Anexo do capítulo I). Alguns ramos foram colapsados para uma melhor visualização.

5.4.2 ZYMV

Foram identificados 1.658.169 *reads* correspondendo ao genoma do vírus ZYMV espécie do gênero *Potyvirus* (Adams et al., 2005). O genoma predito de ZYMV obtido no presente estudo foi denominado ZYMV-TO e uma sequência completa de 9.666 nts, codificando para uma poliproteína. O ZYMV-TO foi alinhado com sequências de espécies para o gênero *Potyvirus*, comparadas e analisados os sítios de clivagem e sequência de aminoácidos (aa) por todo o comprimento do genoma (Figura 24). A análise do isolados ZYMV-TO identificou a presença de motivos conservados como os aa DAG (destacada na Figura 24) na CP_(8.566 - 8.672), como descrito acima para o PRSV-TO.

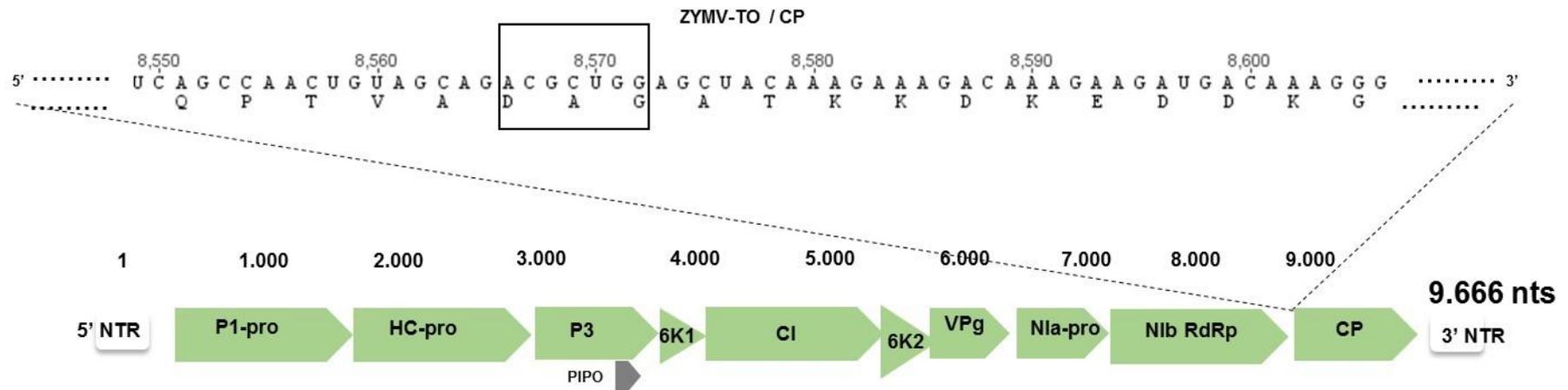


Figura 24: Diagrama proposto para a estruturação da poliproteína ZYMV-TO no genoma viral. As setas interrompidas indicam o potencial local de clivagem interna das proteínas, bem como uma pequena ORF (seta cinza) das proteínas PIPO e P3N-Pipo. Na extremidade 3' a sequência que codifica um tripeptídeo envolvido na transmissão por afídeos é mostrada (DAG). O tamanho do genoma do vírus ZYMV-TO está indicado na figura (9.666 pb).

Com base nas análises das sequências conservadas dos sítios de clivagem, a partir de estudos anteriores (Adams et al., 2005; 2015) foram preditas dez proteínas maduras (P1, HC-Pro, P3, 6k1, CI, 6k2, NIa-VPg, NIa-pro, NIB e CP) produzidas a partir da poliproteína. A análise da poliproteína, na junção entre as proteínas estão previstas na Tabela 9 para ZYMV-TO e não foram observadas alterações nos resíduos de clivagem, quando comparados com os vírus já descritos para a espécie.

Tabela 9: Identificação dos possíveis sítio de clivagem da poliproteína do vírus ZYMV-TO com ligação dos dez peptídeos maduros. Os números indicam a posição na sequência (aa) e número de vírus da mesma espécie descrita por Adams et al. (2015).

Proteínas	Sítio de clivagem de aa ZYMV	Total Nº de vírus ZYMV
P1 / HC-Pro	VDHY ₁₇₀ /S ₁₁₁₀	44
HC-Pro /P3	YRVG ₁₁₀ /G ₂₂₇₈	39
P3/6K1	VATQ ₂₂₇₈ /A ₃₅₁₆	14
6K1/ CI	VRLQ ₃₅₁₆ /G ₃₆₇₂	36
CI /6K2	VVLQ ₃₆₇₂ /S ₅₅₇₅	45
6K2/ VPg	VRVE ₅₅₇₅ /S ₅₇₃₅	47
VPg/ Nia	VELE ₅₇₃₅ /S ₆₃₀₅	45
NIa/ Nib	VTEQ ₆₃₀₅ /S ₇₀₃₄	46
Nib/ CP	VILQ ₇₀₃₄ /S ₈₅₀₅	420

5.4.2.1 Distribuição e a frequência de SNPs

A distribuição e os tipos de mutações ao longo da região do genoma de ZYMV-TO foram determinados pela porcentagem de identidade entre os *reads* identificados por NGS com frequências entre 3 e 10 %. A distribuição da frequência analisada de 3 %, obteve 355 polimorfismos. Dentre os polimorfismos detectados (Tabela 10) na sequência nucleotídica do isolado ZYMV-TO de 81,5 % foram polimorfismos sem alteração na sequência deduzida de aminoácido (sSNP) e 18,5 % os polimorfismos que causaram variações (nsSNPs). Resultado semelhante ao PRSV-TO a P1 (128 – 1.067) é mais variável no genoma de todos os *Potyvirus* (Adams et al., 2005). Assim, foram observadas 48 bases polimórficas, com 22 nsSNP. A frequência com 10 % mostra a presença 239 polimorfismos (Tabela: 10).

Tabela 10: Resultados de nsSNP baseado nas frequências de variação entre 3 e 10% entre os reads gerado por NGS para o ZYMV-TO

Proteínas	sSNP (81,5 %)	nsSNPs (18,5 %)	sSNP (85 %)	nsSNPs (15 %)
	3%		10%	
P1	26	22	20	11
HC-Pro	37	6	28	4
P3	24	6	15	2
6K1	6	-	4	-
CI	66	9	50	4
6K2	10	2	7	1
Na1VPg	16	8	10	6
Nia	29	-	20	-
NIb	35	7	22	4
CP	40	6	27	5

(-) significa que não foi detectado polimorfismo

5.4.2.2 Análise filogenética

Análise filogenética foi realizada utilizando o isolado ZYMV-TO e 63 sequências de nucleotídeos dos genomas completos de ZYMV (Tabela A1 -Anexo do capítulo I). Observou-se subgrupos e o ZYMV-TO no mesmo clado com um isolado da China (AJ316229). Isto provavelmente indica que compartilham um ancestral comum (Figura 25). Zhao et al. (2003), depois de realizar análise filogenética com isolados geográficos de diferentes partes do mundo, classificou a espécie ZYMV em três grupos bem distintos nomeados I - III: grupo I (a maioria dos isolados da Europa, Japão e alguns isolados China); grupo II (Ásia: Taiwan, Coreia do Sul e Japão) e o grupo III (exclusivamente de isolados chineses) com isolados a partir de abóbora, melão e melancia, incluindo o isolado AJ316229. Logo, possivelmente o isolado ZYMV-TO pertence ao grupo III e pode ter sido introduzido no Brasil a partir de isolado da China (Figura 25)

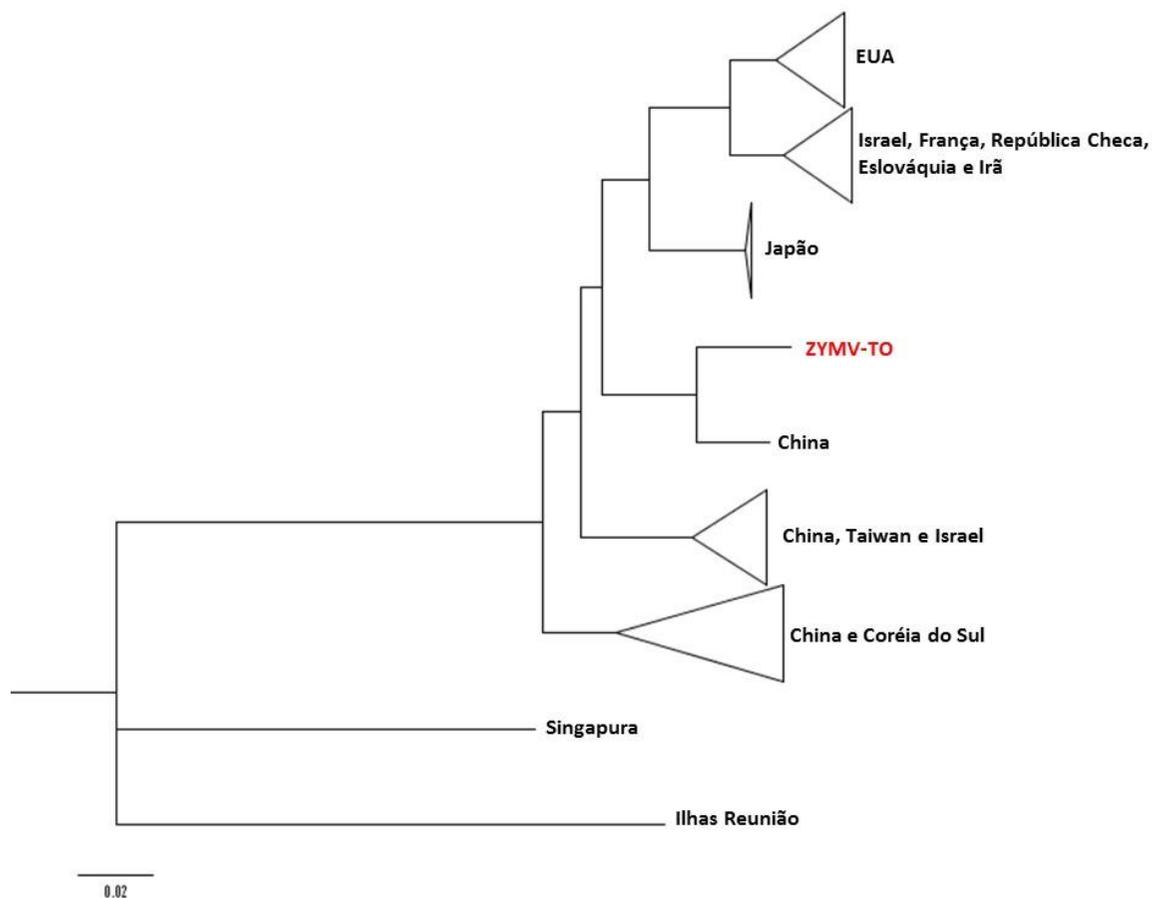


Figura 25: Análise filogenética do ZYMV-TO. Árvore filogenética mostrando o ZYMV-TO e 63 sequências nucleotídicas completas do genoma viral de ZYMV. Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, programa PhyML 3.0. A barra na parte inferior do lado esquerdo mostra o número de substituições/sítio. A árvore foi enraizada por *midpoint* (Tabela A1 -Anexo do capítulo I). Alguns ramos foram colapsados para uma melhor visualização.

A análise filogenética do gene da CP de ZYMV foi realizada entre o isolado ZYMV-TO e 331 sequências nts (Tabela A1-Anexo do capítulo I), observou-se também subgrupos de acordo com a origem geográfica dos isolados, com dois principais grupos dos isolados ZYMV (Figura 26). Estes resultados sugerem que o ZYMV pode ter sido introduzido no Brasil em mais de uma ocasião, provavelmente por sementes de hospedeiro potencialmente infectadas por ZYMV, servindo como reservatórios virais eficazes e disseminador geográfico (Simmons et al., 2011; Greber et al., 1988).

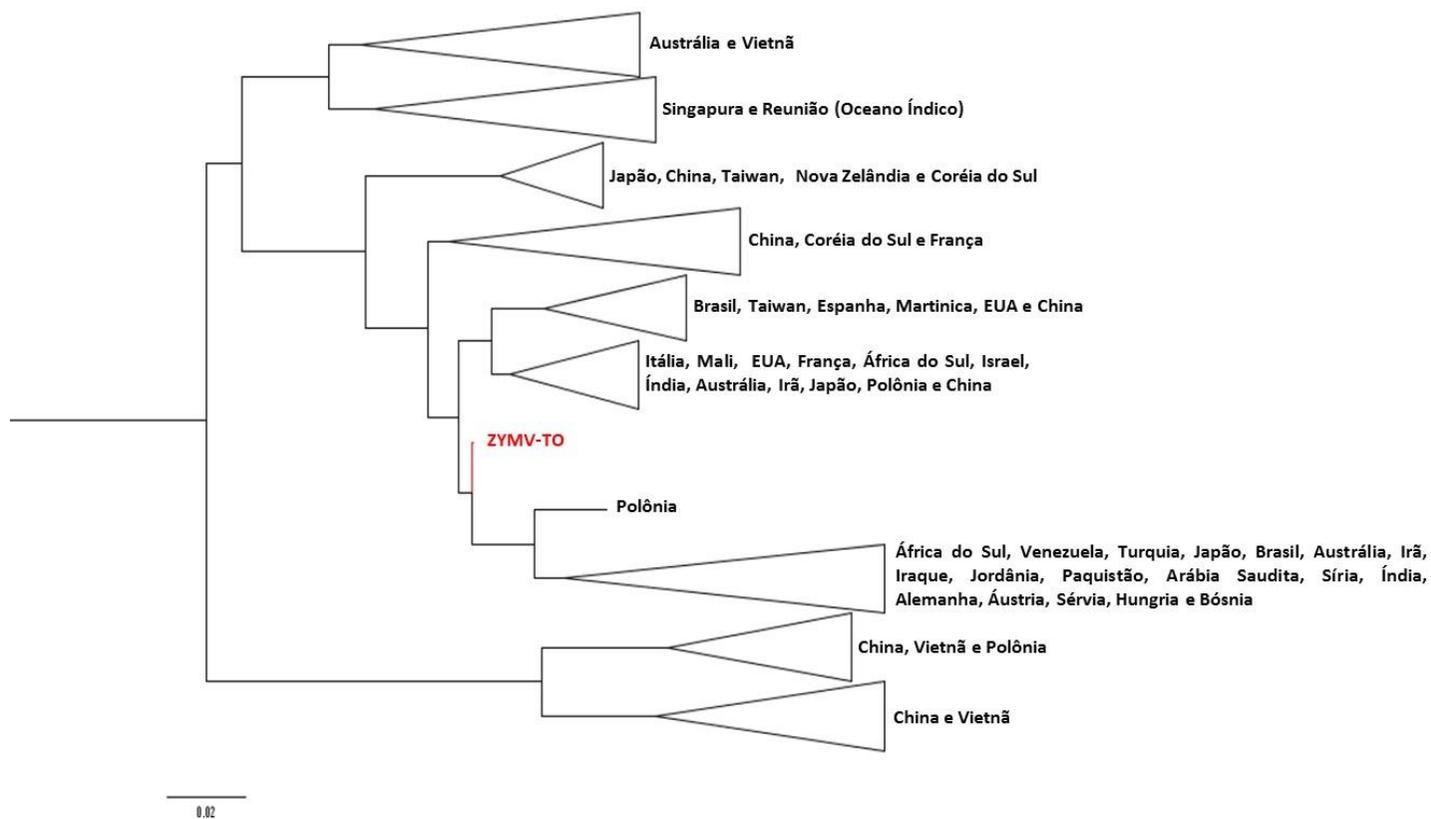


Figura 26: Análise filogenética do ZYMV-TO (CP). Árvore filogenética mostrando o ZYMV-TO e 331 sequências nucleotídicas completas da CP viral de ZYMV. Construída pelo método de Máxima Verossimilhança, programa PhyML 3.0. A barra na parte inferior do lado esquerdo mostra o número de substituições/sítio. A árvore foi enraizada por *midpoint* (Tabela A1 -Anexo do capítulo I). Alguns ramos foram colapsados para uma melhor visualização.

5.4.3 Amplificação com oligonucleotídeos específicos (PRSV-TO e ZYMV-TO)

A partir do RNA total extraído das folhas de melancia infectadas dos municípios de Porto Nacional (PN) e Lagoa da Confusão (LC) foi amplificado um fragmento com cerca de 524 pb para o par de oligonucleotídeo PRSV_TO/F e R e com cerca de 702 pb, para ZYMV_TO/F e R (Figura 27) com oligonucleotídeos específicos para os vírus PRSV-TO e ZYMV-TO. Os fragmentos obtidos foram confirmados por sequenciamento pelo método Sanger.

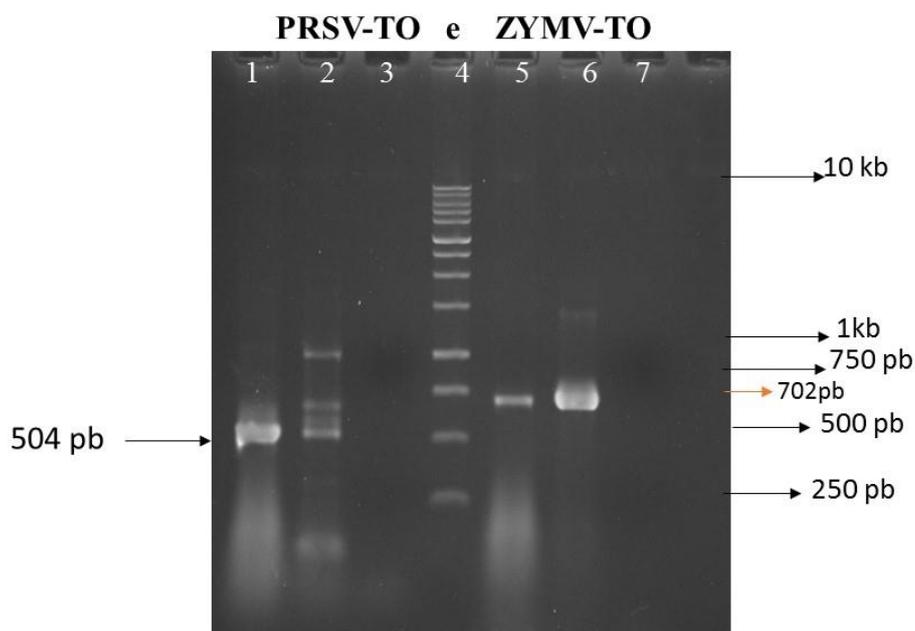


Figura 27: Detecção dos vírus PRSV e ZYMV em plantas de melancia com sintomas de infecção viral. Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da amplificação por RT-PCR usando os pares de oligonucleotídeos PRSV_TO F/R (524 pb) e ZYMV-TO F/R (702 pb), a partir do RNA total das folhas de melancia do inóculo de campo dos municípios de Porto Nacional (PN) e Lagoa da Confusão (L): (1) PN, (2) L (PRSV_TO F/R), (3) Branco da reação; (4) Marcador 1kb ladder Promega; (5) PN, (6) L (ZYMV-TO F/R), (7) Branco da reação.

5.5 Partitivírus (*Deltapartitivirus*)

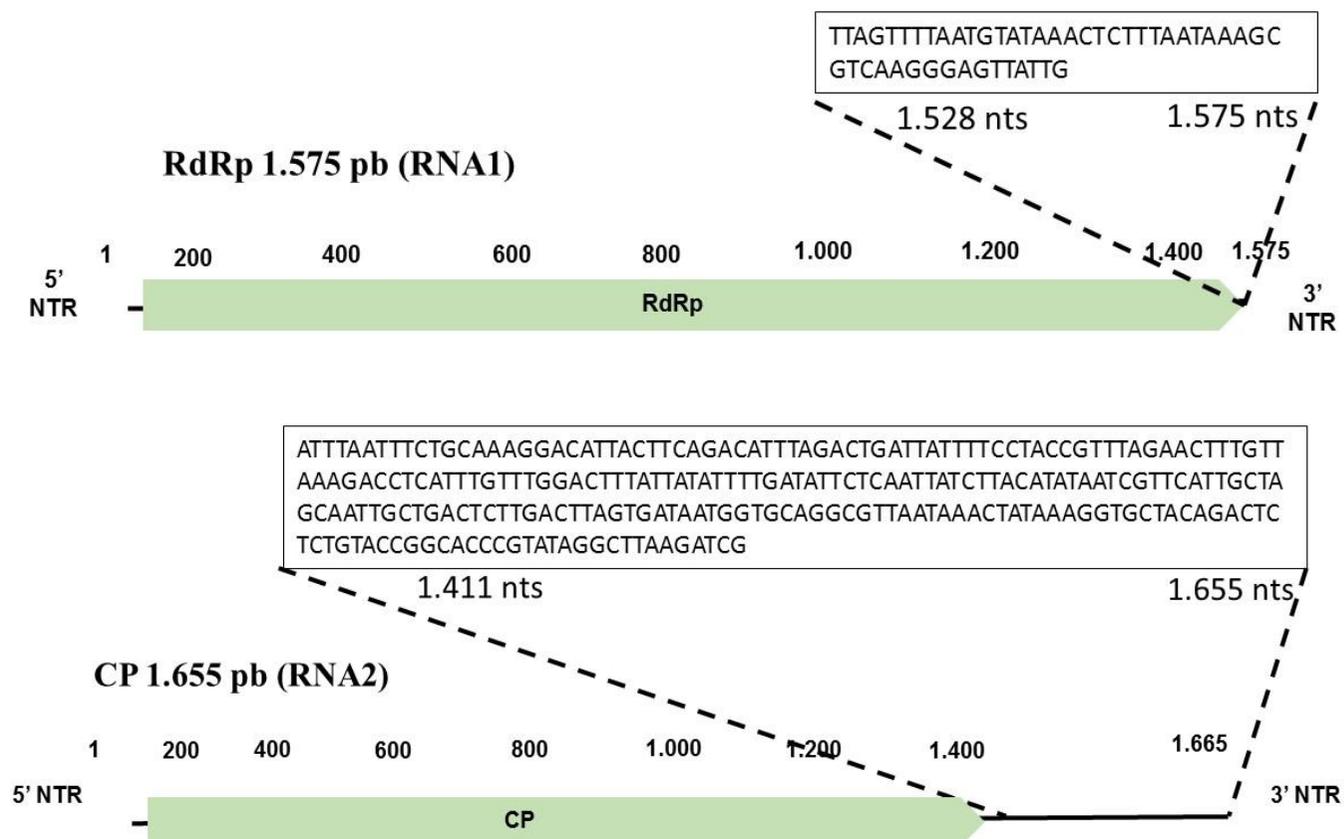
Os resultados revelam a detecção de vírus de dsRNA no total de 5.058 *reads*, distribuído em dois segmentos RNA1 com 2.982 *reads* e RNA2 com 2.076 *reads*. Provavelmente, correspondendo ao genoma de espécie pertencente à família *Partitiviridae*, gênero *Deltapartitivirus*. Dois *contigs* foram obtidos com sequências completas correspondentes à RdRp (RNA1), com 2.067 pb e outro de 1.630 pb para a CP (RNA2). Esta baixa cobertura, possivelmente, seja devido à forma passiva como são

transmitidos, tais como divisão celular, semente e pólen infectados. Cabe ressaltar que até o momento, não foram descritas proteínas de movimento codificadas para membros dessa família *Partitiviridae* (Ghabrial et al., 2005; 2008; 2011).

O gênero *Deltapartitivirus* em melancia ainda não foi relatado no Brasil e este trabalho fez a montagem e anotação do genoma dos dois segmentos de um partitivírus com 1.575 pb (RNA1) e por 1.655 pb (RNA2), o primeiro representante brasileiro, que foi denominado CiLPV-TO (*Citrullus lanatus partitivirus* -TO). Os partitivírus apresentam poucos genomas sequenciados disponíveis em bancos de dados de sequências. Até 2014, as sequências depositadas no GenBank de espécies taxonomicamente aprovadas, com sequências completas codificadoras de RdRp e CP eram: *Alphapartitivirus* (quinze); *Betapartitivirus* (dezenove); *Gammapartitivirus* (nove); *Deltapartitivirus* (treze); e *Cryspovirus* (um) (Nibert et al., 2014). Isso pode ser devido, provavelmente à difícil caracterização desses vírus (baixa concentração em seus hospedeiros). Além da análise filogenética, outros critérios na demarcação do gênero no táxon são observados, a diferença entre o segmento do genoma ou tamanho das proteínas, os RdRps são mais curtos que as CPs nos *Deltapartitivirus* (King et al., 2011; Nibert et al., 2014). Estudos revelam que sequências conservadas nas extremidades (5'-3' NTR) não têm sido descritas com exatidão, pois os números de sequências geradas são insuficientes, porém, destacam a observação do teor de resíduo de adenosina (A) na extremidade 3' para os partitivírus. Contudo, os comprimentos dessas regiões ricas em 'A' apresentam variação nos clones para o mesmo isolado e são comumente interrompidas por resíduos não-A (Nibert et al., 2014).

O CiLPV-TO foi alinhado com sequências nts e aas das espécies do gênero *Deltapartitivirus*, comparadas e analisadas por todo o comprimento do genoma. O resultado foi a confirmação da identificação de um partitivírus que infecta melancia, o *Citrullus lanatus cryptic virus* (CiLCV) com 98 % identidade de aa com o RNA1 (nº de acesso no GenBank = KC429582) e 93 % com RNA2 (nº de acesso no GenBank = KC429583). Este partitivírus foi isolado da co-infecção com MNSV (*Melon necrotic spot virus*) em campos de cultivo de melancia em Israel (Sela et al., 2013). Em relação ao genoma, do CiLPV-TO mostrou-se maior em comparação com o CiLCV e o seu RNA1 é menor em relação ao seu RNA2. Uma ORF (RdRp) com cerca de 1.434 pb e a outra ORF (CP) com cerca de 1.224 pb foram identificadas. Na extremidade 3' NTR foi identificada adenina (A) com 28 % para RNA1 e RNA2 e Timina (T) com 29 % e 37,4

%, respectivamente. Os dois segmentos apresentaram variações com outros nucleotídeos (Figura: 28).



:

Figura 28: Diagrama mostrando a estrutura do genoma do CiLPV-TO. Dois segmentos, RNA1 de 1.575 pb, codificando a RdRp e RNA 2 de 1,655 pb, codificando a CP são mostrados na figura. As sequências nas extremidades 3' NTR (na caixa) ricas em adenina e timina (RNA1_{1.528-1.575} e RNA2_{1.411-1.655}), também são mostradas.. Figura construída usando o programa Geneious.

5.5.1 Extração de dsRNA em plantas assintomáticas

Na tentativa de detecção do possível partitivírus em plantas assintomáticas as amostras foram processadas para análise de dsRNA com diferentes protocolos. Várias extrações foram realizadas, com 10, 20 e 100 g de material vegetal por extração (cultivares Manchester e Top Gun), cultivadas em condições controladas (“plantas saudas” sem inoculação). Com 10 g não foi possível a visualização no gel do dsRNA e com 20 e 100 g foi visualizado, mas não foi observado diferença na concentração entre as duas quantidades. A fim de visualizar e verificar a qualidade do dsRNA extraído, as amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de agarose 1% (RNase free) com 20 μ L das amostras extraídas de 20 g de folhas. Na Figura 29 foi observado a presença de várias bandas de dsRNA, inclusive com os tamanhos dos fragmentos correspondentes ao RNA1 e RNA 2 do CiLPV-TO (1.575 - 1.655 pb), mas, em baixa concentração. Isso pode ser devido à sua baixa titulação no hospedeiro (Ghabrial et al., 2008; 2011). Estudos futuros deverão ser realizados para caracterização biológica e a geração de conhecimento sobre sua epidemiologia.

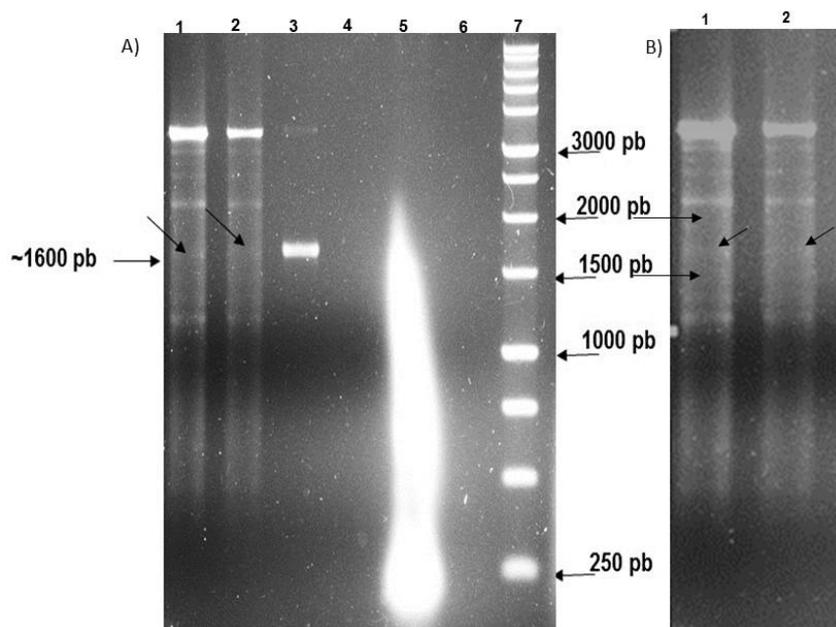


Figura 29: Extração de dsRNA das cultivares de melancia (manshester e top gun) resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 1% (RNase free). A) Amostras e controles das extrações: (1) dsRNA-cv Manchester, tratada com sal, DNase e RNase “A”; (2) dsRNA-cv top gun tratada com sal, DNase e RNase “A”; (3) DNA plasmidial na ausência de DNase, (4) DNA plasmidial na presença de DNase; (5) sRNA na ausência de RNase, (6) sRNA na presença de RNase; (7) M 1Kb Promega. B) O mesmo gel com zoom das fileiras com os resultados da extração. As setas pretas indicam um fragmento com cerca de 1.600 pb, que corresponde, talvez ao genoma de um partitivírus (1.575 - 1.655 pb)

Não foi possível detectar a presença do CiLPV-TO por RT-PCR, a partir do dsRNA extraído de plantas “sadias” (assintomáticas) e RNA total de plantas com sintomas de campo (das três regiões). Várias hipóteses podem ser consideradas como a concentração e qualidade do RNA; baixa concentração do vírus na planta; material vegetal de outros indivíduos (não extraído do inóculo inicial).

5.5.2 Análise filogenética

A análise filogenética é o critério mais usado na classificação taxonômica para demarcação do gênero no táxon dentro da família *Partitiviridae*. Apesar do número pequeno de sequências completas depositada no Genbank, a filogenia vem sendo utilizada pelos taxonomistas (King et al., 2011; Nibert et al., 2014). Na análise filogenética entre o isolado CiLPV-TO (RdRp) e sequências nts de RdRp (RNA1) de 37 isolados geográfica pertencentes a família *Partitiviridae* (Figura 30 e Tabela A1 -Anexo do capítulo I) revelou claramente quatro grupos. Foi demarcado os gêneros propostos para os partitivírus que infectam fungos e plantas *Alphapartitivirus* (fungos e plantas); *Betapartitivirus* (fungos e plantas); *Gammapartitivirus* (fungos); *Deltapartitivirus* (plantas). No clade de cor verde na Figura 30, são mostrados oito prováveis espécies de vírus que infectam plantas (angiospermas) representantes do gênero *Deltapartitivirus*, em destaque o isolado o CiLPV-TO (vermelho) no mesmo clado com CiLCV (infecta melancia). No clado de cor rosa, são mostrados nove espécies que infectam fungos (ascomiceto) *Gammapartitivirus*, e a espécie tipo para o gênero *Penicillium stoloniferum vírus*. No clado de cor azul, são mostrado doze espécies que infectam fungos (cinco ascomicetos, dois basidiomicetos), enquanto que quatro são representantes de vírus que infectam plantas (angiospermas) e *Atkinsonella hypoxylon vírus*, espécie-tipo para o gênero *Betapartitivirus*. No clado de cor vermelho, o gênero *Alphapartitivirus* foi representado por dez espécies de fungos (quatro ascomicetos, um basidiomicetos), seis que infectam plantas e *White clover cryptic virus 1*, espécie tipo para o gênero (Figura 30).

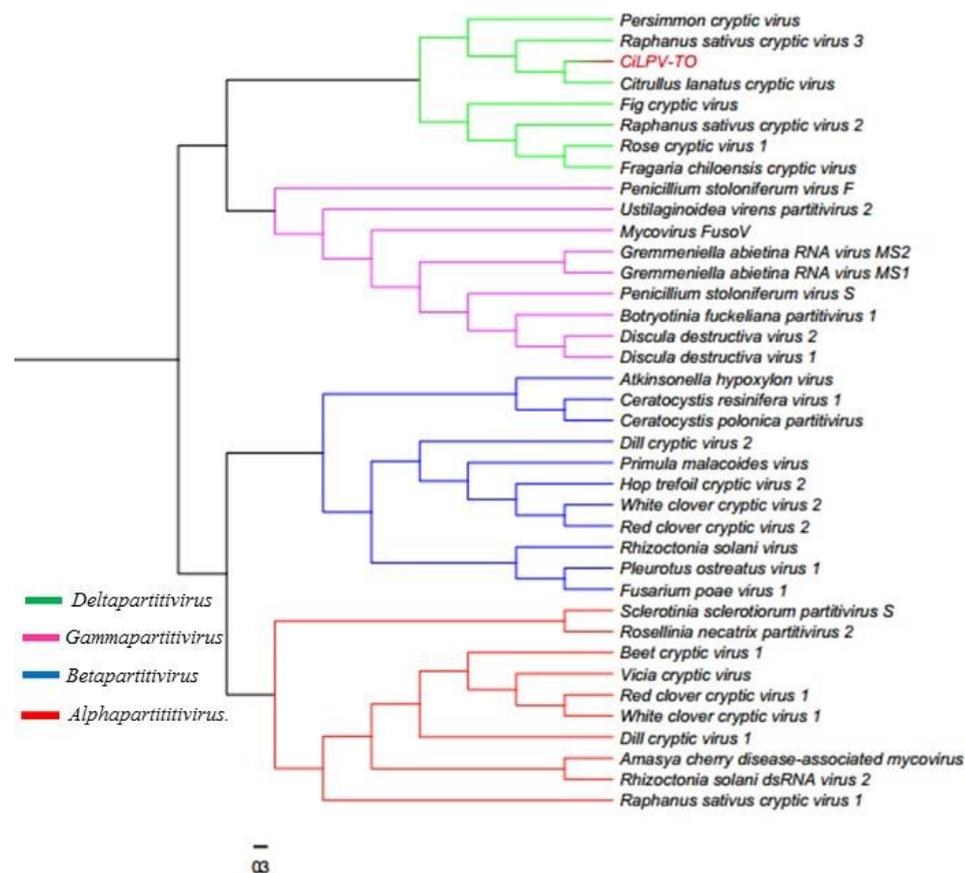


Figura 30 Análise filogenética do CiLPV-TO (CP) representante RNA1 do gênero *Deltapartitivirus*. A análise filogenética foi realizada entre CiLPV-TO (letra vermelha) com 37 sequências nts de RdRp de membros pertencentes aos gêneros *Deltapartitivirus*; *Gammapartitivirus*; *Betapartitivirus* e *Alphapartitivirus*. A árvore foi construída pelo método de Máxima Verossimilhança, programa PhyML 3.0. A barra na parte inferior do lado esquerdo mostra o numero de substituições/sítio. A árvore foi enraizada por *midpoint* (Tabela A1 -Anexo do capítulo I).

Na análise filogenética entre o isolado CiLPV-TO (CP) e sequências nts de CP com 42 isolados geográficos pertencentes à família *Partitiviridae* (Tabela A1 -Anexo do capítulo I) mostrou o agrupamento de diferentes vírus com hospedeiros bem definidos entre plantas e fungos. Os dois isolados que infectam melancia permaneceram no mesmo clado (CiLPV-TO e CiLCV). Os partitívirus que infectam plantas (angiospermas) foram identificados pela cor verde na Figura 31 e os que infectam fungos (ascomicete e basidiomycete) pela cor vermelho.

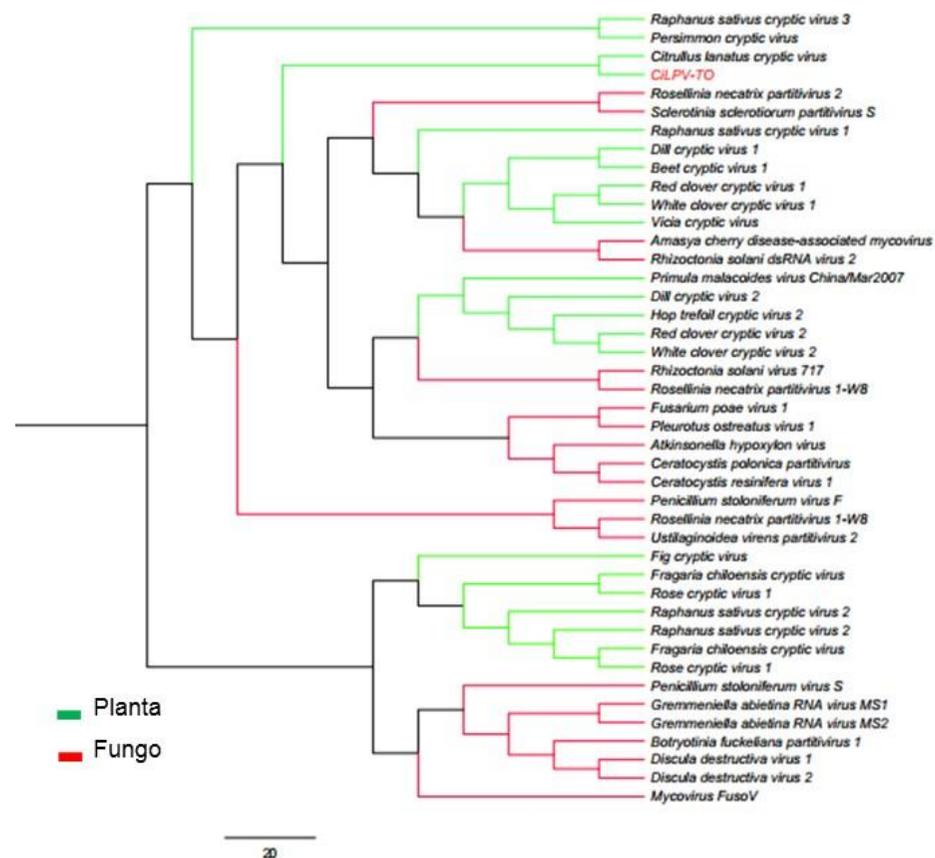


Figura 31 Análise filogenética do CiLPV-TO (CP) representante RNA2 do gênero *Deltapartitivirus*. A análise filogenética foi realizada entre CiLPV-TO (letra vermelha) com 42 sequências nts de CP mostrando vírus que infectam plantas (verde) e fungos (vermelho). A árvore foi construída pelo método de Máxima Verossimilhança, programa PhyML 3.0. A barra na parte inferior do lado esquerdo mostra o número de substituições/sítio. A árvore foi enraizada por *midpoint* (Tabela A1 -Anexo do capítulo I).

5.6 Detecção por dot-ELISA em plantas hospedeiras

A detecção por dot-ELISA foi realizada para confirmação do possível vírus GRSV-TO infectando melancia. Adicionalmente, foram realizados para TCSV e TSWV como controle da reação, uma vez que estes vírus não foram identificados por NGS. Usando o material vegetal a partir do ensaio da gama de plantas hospedeiras, o resultado do dot-ELISA para os três vírus foram negativos. No entanto, o antissoro para GRSV reagiu no inóculo inicial de campo para cada uma das três regiões (Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Porto Nacional) (dado não mostrado).

5.7 Determinação da gama de hospedeiros

Após a inoculação mecânica na gama de plantas hospedeiras foi avaliada a capacidade infectiva dos vírus através de sintomas característicos para cada vírus identificado. No entanto, a transmissão e conseqüentemente a multiplicação viral mostraram-se difícil. Apenas representante de algumas famílias de plantas (Curcubitaceas, Solanaceae, Amaranthacea) reproduziram poucos sintomas (Figura 32). Os sintomas observados no campo não foram totalmente reproduzidos na gama de plantas hospedeiras. Provavelmente, pela baixa titulação do vírus nas amostras e a conservação do inóculo em câmara (- 80 °C). Além disso, apenas um dentre os três gêneros identificado por NGS mostrou sintomas característico (*Potyvirus*) e foi detectado por RT-PCR.



Figura 32: Avaliação de sintomas em gama de plantas hospedeiras no período de 30 a 40 dias após o plantio e inoculação mecânica. As setas indicam os sintomas obtidos. A) *Citrullus lanatus* cv Manchester, anéis cloróticos; B) *Nicotiana rustica*, clorose internerval e mosqueado; C) *Citrullus lanatus* cv Top Gun, com pontos necróticos; D) *Nicotiana rustica*, clorose e bolhas.

5.8 Confirmação dos vírus por RT-PCR

O resultado da RT-PCR com RNAs extraídos da gama de plantas hospedeiras e os pares de oligonucleotídeos específicos para PRSV e ZYMV amplificaram o fragmento esperado. Com relação ao par de oligonucleotídeos PRSV/TO-F/R, este amplificou o tamanho esperado de cerca de 504 (dados não mostrados) em 5 amostras (Tabela 11) e o par de oligonucleotídios ZYMV/TO-F/R amplificou o tamanho esperado com cerca de 702 pb (dados não mostrados), em 9 amostras (Tabela 11).

Tabela 11: Análise dos sintomas no período de 30 a 40 dias após a inoculação e identificação por RT-PCR de vírus infectando plantas hospedeiras.

Família das plantas hospedeiras	Espécie e cultivar	Nome comum	nº infectado / nº plantas inoculadas	Sintomas	**Infecção sistêmica (RT-PCR RNA total poll)
Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	Quinoa	1/5	LL	RN
Amaranthaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Amarantico	3/5	LL	RN
Solanaceae	<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	1/5	MA	RN
Solanaceae	<i>N. rustica</i>	Tabaco	3/5	VC e B	RN
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	Erva daninha	2/5	MA	RN
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate	1/3	SS	RN
Solanaceae	<i>Capsicum annum</i>	Pimenta	0/5	SS	RN
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Manchester	Melancia	2/5	LL, AC,	RN
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Top Gun	Melancia	1/5	AC, FQ	RN
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Fayrsax	Melancia	2/5	MA, LL	ZYMV
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Crinson-Sweet	Melancia	3/5	MA, AC	RN
Cucurbitaceae	<i>C. lanatus</i> cv Charleston Gray	Melancia	0/5	SS	ZYMV
Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i> cv JL dourado	Melão	0/5	SS	PRSV, ZYMV
Cucurbitaceae	<i>C. melo</i> cv Yellow melon	Melão	1/5	MA	ZYMV
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> cv SMR8 (hybrid)	Melão	0/5	SS	PRSV, ZYMV
Cucurbitaceae	<i>C. sativus</i> cv Caipira	Melão	2/5	MA	ZYMV
Cucurbitaceae	<i>C. sativus</i> cv Magnon	Melão	2/5	MA, LLI	RN
Cucurbitaceae	<i>C. sativus</i> cv Wycosir	Melão	3/5	MA, LL	ZYMV
Cucurbitaceae	<i>C. sativus</i> cv Carplra	Melão	0/5	SS	PRSV, ZYMV
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i> cv Marantira	Abóbora	1/5	MA	ZYMV
Cucurbitaceae	<i>C. pepo</i> cv Brasileira	Abobrinha	2/5	MA	RN
Cucurbitaceae	<i>C. pepo</i> cv Caserta	Abobrinha	1/5	MA	PRSV, ZYMV
Cucurbitaceae	<i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i> hybrid cv Cabotiá	Cabotiá	0/5	SS	RN
Cucurbitaceae	<i>C. moschata</i> cv Jacarezinho	Abóbora	1/5	MA	PRSV

AC – Anel clorótico; FQ - folha hastes queimado; LL - lesão local; MA - mosaico amarelo; CV - clorose veinal; B - formação de bolhas; SS – Sem Sintomas; *PRSV (*Papaya ringspot virus*); ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*); GRSV (*Groundnut ringspot virus*) ** Infecção sistêmica em plantas foi determinada por extracção de RNA total de folhae apical testadas por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos de vírus; RN – Reação Negativa

No entanto, os resultados observados na tabela 11 para os isolados PRSV-TO, ZYMV-TO e GRSV-TO em plantas hospedeiras, sugere que provavelmente o inóculo estava em baixa concentração e/ou baixo poder infectivo, pois as plantas que não apresentaram sintomas foram amplificadas por RT-PCR. Assim, o experimento com gama de plantas hospedeiras não foram conclusivos e deverá ser repetido.

6 Conclusão

Foi possível identificar e analisar quatro genomas de vírus (GRSV, PRSV, ZYMV e um isolado pertencente ao gênero *Deltapartitivirus*) a partir do sequenciamento do RNA total de plantas de melancia com sintomas de infecção viral de três regiões produtoras do estado do Tocantins. A detecção destes vírus por NGS mostrou-se mais sensível quando comparado com detecção por técnicas convencionais e especialmente para vírus com baixa titulação em seus hospedeiros (GRSV e *Deltapartitivirus*).

Este trabalho apresenta o primeiro relato da sequência completa e análise filogenética do genoma completo do isolado de GRSV presente em campo de produção de melancia no norte do Brasil. Também um novo vírus infectando melancia, que pertence a família dos *Partitiviridae* do gênero *Deltapartitivirus* e ainda não relatado no Brasil.

Esse primeiro estudo utilizando NGS para as regiões de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Porto Nacional poderão servir como referência para análise epidemiológica espaciais, temporais e populacionais nesses campos, bem como no desenvolvimento, conhecimento do processo evolutivo desses vírus.

Com o volume de resultados gerados por NGS aumenta expectativa de crescimento na inovação e conhecimento de áreas afins e especialmente para a agricultura. As informações geradas com essa tecnologia têm contribuído muito na elucidação da diversidade genética, estudos de evolução e interações planta/patógeno (Barba et al., 2014).

Referências bibliográficas

- ABDALLA, O. A.; BRUTON, B.D.; FISH, W.W.; ALI, A. First Confirmed Report of *Tobacco ringspot virus* in Cucurbits Crops in Oklahoma. **Plant Disease**, v.96, p. 1.705.2, 2012.
- ADAMS, M.J. **Cleavage sites in the family Potyviridae**. 2012. Disponível em: www.dpvweb.net/potycleage/>. Acesso em: 12/11/ 2015.
- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Archives of Virology**, v.150, p.459-479, 2005.
- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; KREUZE, J. *Virgaviridae*: a new family of rod-shaped plant viruses. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1967-72, 2009a.
- ADAMS, I.P.; GLOVER, R. H.; MONGER, W.A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 537–45, 2009b.
- ADKINS, S.; QUADT, R.; AHIQUIST, P.; GERMAN, T. An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of *Tomato spotted wilt virus*, a plant- and insect- infecting bunyavirus. **Virology**, v. 207, p. 308-11, 1995.
- AGUIAR, R.W. de S.; RODRIGUES A.P.; A.C.F.; LOPES, M.M.; LIMA, F.M.; RESENDE, R.O.; NAGATA, T. Serological Identification of Virus in Watermelon Production Fields in the Tocantins State. Brazilian. **Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 192-97, 2014.
- ALI, A.; ABDALLA, O.; BRUTON, B.; FISH, W. SIKORA, E. ZHANG, S. TAYLOR, M. Occurrence Of Viruses Infecting Watermelon, Other Cucurbits, and Weeds in the Parts of Southern United States. **Plant Health Progress**. 2012. Disponível em: <<https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2012/viruses/>>. Acesso em: 02/04/2014.
- ALMEIDA, M.M.S.; ORÍLIO, A.F.; MELO, F.L.; RODRIGUEZ, R; FELIZ, A. X.; MARTÍNEZ, C. R. T; RESENDE, R. deO. The First Report of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) Infecting Long Beans and Chili Peppers in the Dominican Republic. **Plant Disease**, v. 9, p. 1285, 2014.
- AL-MUSA A, ANFOKA G, AL-ABDULAT A, MISBEH S, HAJ AF.; OTRI, I. *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV): A serious disease threatening watermelon production in Jordan. **Virus Genes**, v.43, p. 79–89, 2011.
- ALTSCHUL, SF; GISH, W; MILLER, W; MYERS, E.W; LIPMAN D.J. A basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN D.J. Gapped Blast and PSI-Blast: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-402, 1997.

ANDRET-LINK, P.; FUCHS, M. Transmission specificity of plant viruses by vectors. **Journal of Plant Pathology**, v.87, p. 153-65, 2005.

AROCHA, Y.; VIGHERI, N.; NKOY-FLORENT, B.; BAKWANAMAHA K.; BOLOMPHETY, B.; KASONGO, M.; BETTS, P.; MONGER, W.A.; HARJU, V.; MUMFORD, R.A.; JONES, P. First report of the identification of *Moroccan watermelon mosaic virus* in papaya in Democratic Republic of Congo. **Plant Pathology**, v.57, p. 387. 2008.

ATREYA, P.L., ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. **Proceedings of National Academy of Sciences – PNAS**, v.88, p. 7887-91, 1991.

ATREYA, P.L.; LOPEZ-MOYA, J.J.; CHU, M.; ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyviral transmission by aphids. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 265-70, 1995.

AVGELIS, A.D. Watermelon necrosis caused by a strain of *Melon necrotic spot virus* **Plant Pathology**, v. 38, p. 618-22, 1989.

AZAD, M.D.A.; K. AMIN, L.; SIDIK, N.M. Gene Technology for *Papaya Ringspot Virus* Disease Management. **The Scientific World Journal. Hindawi Publishing Corporation**, v. 1 de 2014, p. 1-11, 2014.

BANANEJ, K.; DESBIEZ, C.; GIRARD, M.; WIPF-SCHEIBEL, C.; VAHDAT, I.; KHEYR-POUR, A.; AHOONMANESH, A.; LECOQ, H. First Report of *Cucumber vein yellowing virus*, Cucumber, Melon, and Watermelon in Iran. **Plant Disease**, v. 90, p. 1113, 2006.

BARBA, M. CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing. **Viruses**, v. 6, p. 106-136, 2014.

BEZERRA, I.C.; RESENDE, R.deO.; POZZER, L.; NAGATA, T.; KORMELINK, R.; de AVILA, A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, v. 89, p. 823-30, 1999.

BREITBART, M.; ROHWER, F.; Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing. **Biotechniques**, v. 39, p.729 –36, 2005.

BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H.; MARKHAM, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, *Tomato pseudo-curly top virus*, suggests a recombinant origin. **Virology**, v. 219, p. 387-94, 1996.

BROWN, J.K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-*Begomovirus* complexes. **Virus Research**, v. 71, p. 233–60, 2000.

CHAPMAN, E.; HILSON, P.; GERMN, T.L. Association of L protein and in vitro *Tomato spotted wilt virus* RNAdependent RNA polymerase activity. **Intervirology**, v. 46, p. 177-81, 2003.

CHEN, J.; ADAMS, M.J. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of Virology**, v. 146, p.757–66, 2001.

CHEN, T.-C.; LU, Y.-Y.; CHENG, Y.-H.; CHANG, C.-A.; YEH, S.-D. *Melon yellow spot virus* in watermelon: a first record from Taiwan. **Plant Pathology**, v. 57, p.765, 2008.

CHOI, G.S. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea. **Plant Pathology Journal**, v.17, p. 243–8, 2001.

CHUNG, B.Y.-W.; MILLER, W.A.; ATKINS, J.F.; FIRTH, A.E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences-PNAS**, v. 105, p. 5897-5902, 2008.

CIUFFO, M.; KUROWSKI, C.; VIVODA, E.; COPES, B.; MASENGA, V.; FALK, B. W.; TURINA, M. A new *Tospovirus* sp. in cucurbit crops in Mexico. **Plant Disease**, v. 93, p. 467-74, 2009.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characterization of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 475-83, 1977.

CLOKIE, M.R.J.; MILLARD, A.D.; LETAROV, A.V.; HEAPHY, S. Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, p. 31-45, 2011.

de ÁVILA, A.C.; de HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.deO.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 153-9, 1993.

de ÁVILA, A.C.; REIS, A. Doenças do meloeiro (*Cucumis melo*) causadas por vírus. EMBRAPA. **Comunicado Técnico. n. 54**, 6 p. 2007.

de HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.deO.; van POELWIJK, F.; PETERS, D.; GOLDBACH, R.W. *Tomato spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2207, 1991.

DELWART, E.L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 115–31, 2007.

DIAS, R.C.S.; RESENDE, G.M.; CORREIA, R.C.; COSTA, N.D.; BARBOSA, G.S.; TEIXEIRA, F.A. Sistema de produção de melancia: custos e rentabilidade. **Sistemas de produção (INFOTECA-E) Embrapa Semiárido**, 2010. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/index.htm>>. Acesso em 23/06/2015.

DODDS, A.J.; MORRIS, J.T.; JORDAN, L.R. Plant viral double-stranded RNA. **Annu Review of Phytopathology**, v. 22 151–168, 1984.

EDWARDS, R.A.; ROHWER, F.; Viral metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 504–10, 2005.

EGEL, D.S.; ADKIN, S. *Squash vein yellowing virus* Identified in Watermelon (*Citrullus lanatus*) in Indiana. **Plant Disease**, v. 91, p. 1056, 2007.

EHYA, F.; MONAVARFESHANI, A.; FARD, E.M.; FARSAAD, L.K.; NEKOU EI, M.K.; MARDI, M.; SALEKDEH, G.H. Phytoplasmal-responsive microRNAs modulate hormonal, nutritional, and stress signaling pathways in Mexican lime trees. **Plos One**, v. 8, p. e6372, 2013.

EL-BOROLLOS, A.M.; WAZIRI, H.M.A. Molecular characterization of a *Cucumber mosaic cucumovirus* isolated from lettuce in Egypt. **Annals of Agricultural Science**, v. 58, p. 105–09, 2013.

FAO – Food Agriculture organization of the United Nations., 2014. **Countries by commodities – Top Production - Watermelons 2010**. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org/29/1/15>>. Acesso em: 29/01/2015.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus taxonomy**: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. United States of America. New York, Elsevier, 1338 p. 2005.

FEDURCO, M.; ROMIEU, A.; WILLIAMS, S.; LAWRENCE, I.; TURCATT, G.B.T. A novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 2-13, 2006.

FIGTREE. **FigTree v1.4.1**. Disponível em: <<http://tree.bio.ac.uk/software/figtree>>. Acesso em: 02/03/2013.

GHABRIAL, S.A.; BUCK, K.W.; HILLMAN, B.I.; MILNE, R.G. Family *Partitiviridae*. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.). **Virus Taxonomy**: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, Elsevier Academic Press, p. 581–590. 2005.

GHABRIAL, S.A.; OCHOA, W.F.; BAKER, T.S.; NIBERT, M.L. *Partitiviruses*: General features. In MAHY, B.W.J.; vanREGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). **Encyclopedia of Virology**, 3 ed. Academic Press: Oxford, p. 68–75. 2008.

GHABRIAL, S.A.; NIBERT, M.L.; MAISS, E.; LESKER, T.; BAKER, T.S.; TAO, Y.J. Family *Partitiviridae*. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Eds.). **Virus Taxonomy**: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, Elsevier Academic Press, p. 523–534. 2011.

GILBERT, S.G.; PARKER, I.M. Rapid evolution in a plant-pathogen interaction and the consequences for introduced host species. **Blackwell Publishing**, v. 3, p.144–156, 2010.

GREBER, R.S.; PERLEY, D.M.; HERRINGTON, M.E. Some characteristics of Australian isolates *Zucchini yellow mosaic virus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 39, p. 1085-94, 1988.

GUINDON S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v.5, p.696-704, 2003.

HALL, R.J.; WANG, J.; TODD, A.K.; BISSIELO, A.B.; YEN, S.; STRYDOM, H.; MOORE, N.E.; REN, X.Q.; HUANG, S.; CARTER, P.E.; PEACEY, M. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. **Journal of Virological Methods**, v. 195, p.194–204, 2014.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 669-85, 2004.

HAGEN, C.; FRIZZI, A.; KAO, J.; JIA, L.; HUANG, M.; ZHANG, Y.; HUANG, S. Using small RNA sequences to diagnose, sequence, and investigate the infectivity characteristics of vegetable-infecting viruses. **Archives. Virology**, v.156, p. 1209–1216, 2011.

HOGENHOUT S.A.; AMMAR E.D.; WHITFIELD, A.E.; REDINGBAUGH, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46: 327-59, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário estatístico do Brasil**. 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/20/aeb_2014.pdf>. Acesso em: 22/07/2015.

ICTV International committee on taxonomy of viruses—**Approved virus orders, families and genera**. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy>>. Acesso em: 11/04/2015.

ILLUMINA **Solexa. Technology**: illumine sequencing technology. Disponível em: <<http://www.illumina.com/pages.ilmn>> Acesso em: 15/06/2015.

IWAKI, M.; HONDA, Y.; HANADA, K.; TOCHIHARA, H.; YONAHARA, T.; HOKAMA, K.; YOKOYAMA, T. Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. **Plant Disease**, v.68, p. 1006-08, 1984.

JONES, M.S.; KAPOOR, A.; LUKASHOV, V.V.; SIMMONDS, P.; HECHT, F.; DELWART, E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. **Journal of Virology**, v.79, p. 8230–36, 2005.

JONSSON, C.B.; FIGUEIREDO, L.T.; VAPALAHTI, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, 412-41, 2010.

KHAN, Z.A.; ABDIN, M.Z.; KHAN, J.A. Functional Characterization of a Strong Bi-directional Constitutive Plant Promoter Isolated from Cotton Leaf Curl Burewala Virus. **Plos One**, v. 10, p. e0121656, 2015.

KATO, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 3059-66, 2002.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics applications note**, v. 28, p. 1647-49, 2012.

KHEYR-POUR, A.; BANANEJ, K.; DAFALLA, G. A.; CACIAGLI, P.; NORIS, E.; AHOONMANESH, A.; LECOQ, H.; GRONENBORN B. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: Sequence Comparisons and Identification of a Whitefly-Transmission Determinant. **Phytopathology**, v. 90, p. 629-35, 2000.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. **Virus taxonomy**: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. United States of America: Elsevier, 1338 p. 2011.

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. **Journal of Electron Microscopy**, v. 14, p. 119-21, 1965.

KORMELINK, R.; GARCIA, M.L.; GOODIN, M.; SASAYA, T.; HAENNI, A.L. Negativestrand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. **Virus Research**, v.162, p. 184-202, 2011.

KRISHNAREDDY, M.; SINGH, S.J. Immunological and molecular based diagnosis of tospovirus infecting watermelon. In: JUBILEE G. **Symposium on Horticultural Research: Changing Scenario**. Indian Institute of Horticultural Research Bangalore. p. 247-48. 1993.

LARA-VICTORIANO, F.; CASTILLO-REYES, F.; FLORES-GALLEGOS, C.; AGUILAR, C.N.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Metagenomics in plant pathology. In: HERRERA, R.R.; AGUILAR, C.N.; SIMPSON-WILLIAMSON, J.K.; SANCHEZ, G.G. (Eds.). **Phytopathology in the Omics Era**. Publisher: Research Signpost. p. 1-9, 2011:

LAUCK, M.; ALVARADO-MORA, M.V.; BECKER, E.A.; BHATTACHARYA, D.; STRIKER, R.; HUGHES, A.L.; CARRILHO, F.J.; O'CONNOR, D.H.; PINHO, J.R.R. Analysis of Hepatitis C Virus Intrahost Diversity across the Coding Region by Ultradeep Pyrosequencing. **Journal of Virology**, v. 86, p. 3952-60, 2012.

LAZAROWITZ, S.G.; LAZDINS, I.B. Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a bipartite *Squash leaf curl* geminivirus with a broad host range phenotype. **Virology**, v. 180, p. 58-69, 1991.

LEÃO, E.U.; SPADOTTI, D.M.deA.; ROCHA, K.C.; PANTOJA, K.F.daC.; REZENDE, J.A.M.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SKATE, R. *Citrullu lanatus* is a New Natural Host of *Groundnut ringspot virus* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 163, p.1014-18, 2015.

LECOQ, H.; DAFALLA, G.A.; MOHAMED, Y.F.; PITRAT, M.; OMARA, S.E.; ALI, H.A. A survey on cucurbit viruses in Kordofan, east and central regions of Sudan. University of Khartoum **Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, p. 47-71, 1994.

LEVI, A.; WECHTER, P.W.; THIES, J.A.; LING, K.S, REDDY, U.K; XU, Y.; SHAGOGUI, G.; ZHANG, X. Watermelon. In: WANG, Y-H.; BEHERA, K.T.; KOLE, C (Eds). **Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits**. Science Publishers. p 309-34. 2012.

- LIN, K.-Y.; CHENG, C.-P.; CHANG, B.C.-H.; WANG, W.-C.; HUANG, Y.-W.; LEE, Y.-S.; HUANG, H.-D.; HSU, Y.-H.; LIN, N.-S. Global analysis of small interfering RNAs derived from Bamboo mosaic virus and its associated satellite RNAs in different plants. **Plos One**, v. 5, p. e11928, 2010.
- LIMA, J.A.A.; AMARAL, M.R.G. Purificação e sorologia de *Squash mosaic virus* isolado de melancia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 605-11, 1985.
- LIMA, J.A.A., FERNANDES, E.R.; MENDES, M.L. Identificação sorológica de "*Watermelon mosaic virus 1*" em cucurbitáceas cultivadas e nativas do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 414, 1980.
- LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.K.Q.; BARBOSA, G.daS.; da SILVA, F.R. Viruses Infecting Melon and Watermelon In Northeastern Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 17. p. 1-2, 2012.
- LIMA, M.F.; BARBOSA, L.F.; de ÁVILA, A.C. Levantamento de viroses na cultura da melancia na região do Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 337, 1997.
- LIU, S.; VIJAYENDRAN, D.; BONNING, B.C. Next Generation Sequencing Technologies for Insect Virus Discovery **Viruses**, v.3, 1849-1869, 2011.
- MARTELLI, G.P.; AGRANOVSKY, A.A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R.H.A.; DOLJA, V.V.; FALK, B.W.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A.V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; VETTEN, H.J.; WISLER, G.C.; YOSHIKAWA, N. The Family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2039-44, 2002.
- MARTELLI, G.P.; CANDRESSE, T. *Closteroviridae*. In: WILEY, J. **Sons Ltd, Chichester. Encyclopedia of Life Sciences (eLS)**. 2014. Disponível em: <<http://www.els.net>>. Acesso em: 24/11/2014.
- MELZER, M.J.; SUGANO, J.S.; UCHIDA, J.Y.; BORTH, W.B.; KAWATE, M.K.; HU, J.S. Molecular characterization of *closteroviruses* infecting *Cordyline fruticosa* L. in **Hawaii. Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-6, 2013.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetic**, v. 11. p. 31-46, 2010.
- MOKILI, J.L.; ROHWER, F.; DUTILH, B.E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p. 63-77, 2012.
- OETTING, W.S. Impact of next generation sequencing: the 2009 **Human Genome Variation Society Scientific Meeting. Human Mutation**, v. 31, p. 500-3, 2010.
- NG, T.F.; SUEDEMEYER, W.K; GULLAND, F.; WHEELER, E; BREITBART, M. Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1256;-61, 2009a.

- NG, T.F.F.; MANIRE, C.; BORROWMAN, K.; LANGER, T.; EHRHART, L.; BREITBART, M. Discovery of a novel single-stranded DNA virus from a sea turtle fibropapilloma by using viral metagenomics. **Journal of Virology**, v.83, p. 2500–09, 2009b.
- NG, T.F.F.; WILLNER, D.L.; LIM, Y.W.; SCHMIEDER, R.; CHAU, B.; NILSSON, C.; ANTHONY, S.; RUAN, Y.; ROHWER, F.; BREITBART, M. Broad surveys of DNA viral diversity obtained through viral metagenomics of mosquitoes. **Plos One**, v. 16 e20579, 2011a.
- NG, T.F.F.; DUFFY, S.; POLSTON, J.E.; BIXBY, E.; VALLAD, G.E.; BREITBART, M. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. **Plos One**, v. 6, e19050, 2011b.
- NIBERT, M.L.; GHABRIAL, S.A.; MAISS, E.; LASKER, T.S.; VAINIO, E.J.; JIANG, D.; SUZUKI, N. Taxonomic reorganization of family *Partitiviridae* and other recent progress in partitivirus research. **Virus Research**, v.188, 128–141, 2014.
- PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J.; DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. *Cucumber mosaic virus* Advances in **Virus Research**, v. 41, p. 281–348, 1992.
- PAPPU, H.; JONES, R.A.; JAIN, R.K. Global status of *Tospovirus* epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**. v. 141, p. 219-236, 2009.
- PEREIRA, F.A.; CARNEIRO, M.R.; ANDRADE, L.M. **A cultura da melancia/ Embrapa Meio-Norte**. Brasília. 2. ed: Embrapa Informação Tecnológica (Coleção Plantar, 57). 85 p. 2007.
- PFEFFER, S.; DUNOYER, P.; HEIM, F.; RICHARDS, K.E.; JONARD, G.; ZIEGLER-GRAFF. V P0 Of Beet Western Yellows Virus Is A Suppressor Of Posttranscriptional Gene Silencing. **Journal of Virology**, v. 76, p. 6815-24, 2002.
- POLSTON, J.E.; HLADKY, L.L.; AKAD, F.; WINTERMANTEL, W.M. First Report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in Cucurbits in Florida. **Plant Disease**, v.92: p.1251, 2008.
- POLTRONIERI, L.S.; NOVAES, Q.S.; DIAS, P.R.P.; REZENDE, J.A.M.; TRINDADE, D.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; KITAJIMA, E.W. Constatação do *Zucchini yellow mosaic virus* em cucurbitáceas no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 669, 2000.
- POOJARI, S.; ALABI, O.J.; FOFANOV, V.Y.; NAIDU, R.A. A leafhopper-transmissible DNA virus with novel evolutionary lineage in the family *Geminiviridae* implicated in grapevine redleaf disease by next-Generation sequencing. **Plos One**, v. 8, p. 64194, 2013.
- QUEIROZ, M.A. Germplasm of Cucurbitaceae in Brazil. REVIEW. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 377-83, 2004.

RADFORD, A.D.; CHAPMAN, D.; DIXON, L.; CHANTREY, J.; DARBY, A.C.; HALL, N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. **Journal General Virology**, v. 93 p. 1853–1868, 2012.

RAO, X.; LIU, Y.; WU, Z.; LI, Y. First report of natural infection of watermelon by *Watermelon silver mottle virus* in China. **New disease Reports**, v. 24, p.12, 2011.

RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 369-94, 2003.

REZENDE, J.A.M. *Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsui & Nakai (Melancia) Cucurbitaceae. In: KITAJIMA, E.W. **Programa Biota/Micro-Organismos lista comentada dos vírus de plantas descritos no Brasil (1911-2013)**. Dept. Fitopatologia e Nematologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 2013. Disponível em: <http://www.sbv.org.br/site/downs/virus/Lista_comentada_2011_2013>. Acesso em: 23/02/2014.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, D.; FIGUEIRA, A.R.; DUARTE, P.S.G.; GALVINO-COSTA, S.B.F. Olmedo JG. First Report and Molecular Characterization of an isolate of *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) Detected in Pumpkin in Cuba. **Bioscience Journal**, v. 31: 1133-42, 2015.

ROMÃO, L.R.; QUEIRÓZ, M.A.de.; MARTINS, P.S.; CORDEIRO, C.M.T. Caracterização morfológica de acessos de melancia do banco de Germoplasma (BAG) de cucurbitáceas do Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 23-25, 1999.

ROMAY, G.; LECOQ, H.; DESBIEZ, C. *Zucchini tigre mosaic virus* is a distinct potyvirus in the papaya ringspot virus cluster: molecular and biological insights. **Archives Virology**, v. 159, p. 277-89, 2014.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning. Chapter 1. In:_____. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview. p. 3-170. 2001.

SANFACON, H.; WELLINK, J.L.E.; GALL, O.; KARASEV, A.; van DER VLUGT, R.; WETZE, T. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. **Archives Virology**, v 154, p. 899–907, 2009.

SANGER, F; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS**, v. 74, p. 5463-7, 1977.

SCHEETS, K.; JORDAN, R.; WHITE, K.A.; HERNANDEZ, C. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. **Archives Virology**, v. 160, p. 2385-93, 2015.

SEAGRO - Secretaria de estado da agricultura, pecuária e irrigação do Estado do Tocantins. 2014. Disponível em: <www.agronegocio.goias.gov.br>. Acesso em: 23/01/2015.

SELA, N.; LACHMAN, O; REINGOLD, V.; DOMBROVSKY, A. A new cryptic virus belonging to the family *Partitiviridae* was found in watermelon co-infected with *Melon necrotic spot virus*. **Virus Genes**, v. 47, p. 382-4, 2013.

SILVA, T.F.; ROMANEL, E.A.C.; ANDRADE, R.R.S.; FARINELLI, L.; OSTERAS, M.; DELUEN, C.; CORREA, R.L.; SCHRAGO, C.E.G.; VASLIN, M.F.S. Profile of small interfering RNAa from cotton plants. Infected with the poliovirus *Cotton leafroll dwarf virus*. **BMC Molecular Biology**, v. 12, p. 40, 2011.

SIMMONS, H.E.; HOLMES, E.C.; GILDOW, F.E.; BOTHE-GORALCZYK, M.A.; STEPHENSON, A.G. Experimental verification of seed transmission in *Zucchini yellow mosaic virus*. **Plant Diseases Report**, v. 95: 751–54, 2011.

SPADOTTI, D.M.A.; LEÃO, E.U.; ROCHA, K.C.G.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. First report of *Groundnut ringspot virus* in cucumber fruits in Brazil. **New Diseases Reporters**, v. 29, p. 25-25, 2014.

STUDHOLME, D.J.; GLOVER, R.H.; BOONHAM, N. Application of HighThroughput DNA Sequencing in Phytopathology. High-Throughput DNA Sequencing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 87-105, 2011.

SUTTLE, C.A. Review Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, p. 356-61, 2005.

TAKEDA, A.; SUGIYAMA, K.; NAGANO, H.; MORI, M.; KAIDO, M.; MISE, K.; TSUDA, S.; OKUNO, T. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomatospotted wilt virus. **FEBS Letters**, v. 532, p. 75-79, 2002.

TERAO, D.; CASTRO, J.M.daC.; LIMA, M.F.; BATISTA, D.daC; BARBOSA M.A.G.; REIS, A; DIAS, R. de C. S. Sistema de Produção de Melancia Embrapa. **Sistemas de produção (INFOTECA-E) Embrapa Semiárido**, 2010. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/index.htm>>. Acesso em 23/06/2015.

TERRADOT, L.; SOUCHET, M.; TRAN, V.; DUCRAY-BOURDIN, D.G. Analysis of a threedimensional structure of *Potato leafroll virus* coat protein obtained by homology modeling. **Virology**, v. 286, p. 72-82, 2001.

THOMAS, T; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 3, p. 1-12, 2012.

THOMPSON, J.R.; KAMATH, N.; PERRY, K.L. An Evolutionary Analysis of the *Secoviridae* Family of Viruses. **Plos One**, v. 9, p. e106305, 2014.

THURBER, R.V.; HAYNES, M.; BREITBART, M.; WEGLEY, L.; ROHWER, F. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. **Nature Protocols**, v. 4, p. 470-83, 2009.

TZANETAKIS, I.E.; HALGREN, A.; MOSIER, N.; MARTIN, R.R. Identification and characterization of Raspberry mottle virus, a novel member of the *Closteroviridae*. **Virus Research**, v. 127, p. 26-33, 2007.

TZANETAKIS, I.E.; MARTIN, R.R. A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. **Journal of Virological Methods**, v.149, p. 167–170, 2008.

- URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A. L. & BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, v. 74, p. 157–175, 2001.
- VALVERDE, R. A. Analysis of Double-Stranded RNA for Plant Virus Diagnosis. **Plant Disease**, v. 74, p. 255-58, 1990.
- VEGA, J.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A. Detecção do Vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita no Brasil: Caracterização parcial de um isolado encontrado em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.72-79, 1995.
- VEERISSETTY, V.; BRAKKE, M.K. Purification of Some Legume *Carlaviruses*. **Phytopathology**, v. 68, p. 59-64, 1978.
- VICTORIA, J.G.; KAPOOR, A.; LI, L.L.; BLINKOVA, O.; SLIKAS, B.; WANG, C.; NAEEM, A.; ZAIDI, S.; DELWART, E. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. **Journal of Virology**, v. 83, p. 4642–4651, 2009.
- VIRALZONE. ExPASy: Bioinformatics Resource Portal. **ViralZone** (2015). Disponível em: <www.viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/html>. Acesso em: 23/03/2015.
- VOELKERDING, K.V.; DAMES, S.A.; DURTSCHI, J.D. Next-generation sequencing: From basic research to diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 641–58, 2009.
- WANG, D.; COSCOY, L.; ZYLBERBERG, M.; AVILA, P.C.; BOUSHEY, H.A.; GANEM, D.; DERISI, J.L. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 99, p.15687–92, 2002.
- WEBSTER, C.G.; REITZ, S.R.; PERRY, K.L.; ADKINS, S. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. **Virology**, v. 413, p 216-25, 2011.
- WILLNER, D.; FURLAN, M.; HAYNES, M.; SCHMIEDER, R.; ANGLY, F.E.; et al. Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. **Plos One**, v. 4, p. e7370, 2009.
- WU, H.J.; QIN, B.X.; CHEN, H.Y.; PENG, B.; CAI, J.H.; GU, Q.S. The rate of seed contamination and transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* in watermelon and melon. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 44, p. 1527-32, 2011.
- YAN, F.; ZHANG, H.; ADAMS, M.; YANG, J.; PENG, J.; ANTONIW, J.; ZHOU, Y.; CHEN, J. Characterization of siRNAs derived from rice stripe virus in infected rice plants by deep Sequencing. **Archives Virology**, v. 155, p. 935–940, 2010.
- ZHAO, M.F; CHEN, J.; ZHENG, H.Y.; ADAMS, M.J; CHEN, J.P. Molecular Analysis of *Zucchini yellow mosaic virus* Isolates from Hangzhou, China. **Journal Phytopathology**, v. 151, p. 307–11, 2003.

ZHOU, X.; LIU, Y.; CALVERT, L.; MUNOZ, C.; OTIM-NAPE, G.W.; ROBINSON, D.J.; HARRISON, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v.78, p. 2101–11, 1997.

ZHOU, X.; REN, L.; MENG, Q.; LI, Y.; YU, Y.; YU, J. The next-generation sequencing technology and application. **Protein Cell**, v. 1, p. 520-36, 2010.

ZITTER, T.A.; MURPHY, J.F. *Cucumber mosaic*. **The Plant Health Instructor** *Cucumber mosaic virus*. 2009. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/Cucumbermosaic.aspx>>. Acesso em: 21/03/2014.

CAPÍTULO II

CONSTRUÇÃO DE NOVOS VETORES VIRAIS PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM CÉLULAS DE INSETO

Resumo

Baculovírus são vírus de insetos usados como inseticidas biológicos e como vetores de expressão de proteínas heterólogas em células de insetos. A grande maioria dos vetores disponíveis é derivada do baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e muitos deles estão disponíveis comercialmente. Entretanto, para outros baculovírus, a disponibilidade de vetores é reduzida, e a maioria deles é dependente de recombinação homóloga em células de insetos. Este sistema é trabalhoso e pouco eficiente para a obtenção de um vírus recombinante puro. Em contraste, a transposição sítio-específica em *Escherichia coli*, desenvolvida para o vírus AcMNPV (Manual Bac-To-Bac Baculovirus), é uma estratégia eficiente que reduz o tempo de construção de um baculovírus recombinante, além de facilitar a análise da função de genes virais pela facilidade de deleção de qualquer gene viral. Esse trabalho teve como objetivo, construir um vetor para manipulação do genoma do baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), com base no sistema de transposição sítio-específica em *E. coli* (Manual Bac-To-Bac Baculovirus) a partir do vetor de transferência p2100-KLM, para recombinação homóloga e/ou ligação em sítio único do baculovírus. Originalmente, esse vetor possui sequências do *locus* do gene da poliedrina no genoma do AgMNPV (*Ag-polh*) que flanqueiam o cassete KLM (MiniF-replicon; *miniatt*Tn7 e o gene de resistência a canamicina, Km) sendo usado em três estratégias: i) O p2100-KLM foi cotransfectado com o DNA do recombinante vAgGal (*occ*⁻) que possui o gene da enzima β -galactosidase de *E. coli* no lugar do gene *polh* de AgMNPV e o possível vírus recombinante foi selecionado por diluição seriada em placa de 96 poços e analisado; ii) o p2100-KLM linearizado e transformado em conjunto com genoma vAgGal em células de *E. coli* (cepa BJ5183), para a recombinação homóloga e as possíveis colônias transformantes foram selecionadas e o DNA recombinante analisado; iii) o fragmento KLM, foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos desenhados com sítio único de restrição, *Bsu*36I e/ou *Fse*I. O DNA genômico de AgMNPV, digerido com a enzima de restrição e ligado diretamente no genoma do AgMNPV também digerido com a mesma enzima de restrição. A ligação foi, então, transformada em células eletrocompetentes (DH10B) e as possíveis colônias transformantes foram selecionadas e o DNA recombinante analisado. Essas estratégias foram desenvolvidas na tentativa de construção do recombinante vAgMNPV-KLM e consequentemente o vetor de expressão baseado na metodologia de transposição sítio-específica. No entanto, a integridade do genoma dos possíveis vírus recombinantes obtidos nas diferentes estratégias utilizadas não pôde ser confirmada pelo perfil de enzimas de restrição, quando comparados com o perfil esperado.

Abstract

Baculoviruses are insect virus used as biological insecticides and heterologous protein expression vectors using insect cells. The large majority of available vectors are derived from the *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) baculovirus and are commercially available. However, for other baculovirus, the availability of vectors is reduced and most of them are dependent on homologous recombination in insect cells. This system is laborious and less efficient to obtain a pure recombinant virus. In contrast, site-specific transposition in *Escherichia coli*, developed for the AcMNPV and commercially available from Bac-To-Bac Baculovirus - Invitrogen, is an effective strategy that reduces the construction time of recombinant baculoviruses and facilitates the analysis of the viral genes functions by deletion of any viral gene. This study aimed the construction of a vector for manipulation of the *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) genome. This was based on the site-specific transposition in *E. coli* (Manual Bac-To-Bac Baculovirus) using the transfer vector p2100-KLM for homologous recombination and / or direct ligation of the KLM cassette in a unique restriction site in the baculovirus genome. Originally, this vector include the AgMNPV polyhedrin gene locus sequences (Ag-polh) flanking the KLM cassette (MiniF-replicon; mini attTn7 and the kanamycin resistance gene Km), that was used in three cloning strategies: i) the p2100-KLM was cotransfected with the recombinant AgMNPV virus DNA (vAgGal which is occlusion body negative, occ-) which has the *polh* gene deleted. Inside the insect cells, recombination occurred between the homologous fragments of the plasmid vector and viral genome; ii) the p2100-KLM was amplified by PCR and transformed together with the vAgGal genome, into BJ5183 *E. coli* and inside the bacteria, homologous recombination took place and possible recombinant colonies were selected and the recombinant DNA analysed; iii) the KLM fragment was amplified by PCR with primers designed with unique restriction site *Bsu36I* and *FseI*. The genomic AgMNPV DNA and the amplified KLM fragment were digested with the same restriction enzymes, used in a ligationreaction with T4 DNA ligase and transformed into eletrocompetentes *E. coli* cells (DH10B). Possible recombinant colonies were then selected and the recombinant DNA analysed. These strategies were developed in an attempt to construct the vAgMNPV-KLM recombinant vector based in the site-specific transposition method. However, the recombinant virus genome integrity could not be confirmed by restriction enzyme analysis since the expected restriction profile was not obtained.

1 Introdução

Os baculovírus são vírus envelopados em forma de bastonetes, cujo genoma é constituído por uma molécula de DNA circular de fita dupla, envolto por um capsídeo protéico (nucleocapsídeo), e pode estar imerso em uma matriz protéica cristalina (corpos de oclusão), denominada poliedro ou grânulo (Rohrman 2011). Os vírus que pertencem à família *Baculoviridae* apresentam alta especificidade, portanto, são restritos aos hospedeiros-alvo, que são insetos das ordens: Hymenoptera, Diptera e na sua maioria, Lepidoptera (Rohrman 2011). Com base em evidências filogenéticas, a família está dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovírus de Lepidoptera), *Betabaculovirus* (granulovírus de Lepidoptera), *Gammabaculovirus* (nucleopoliedrovírus de Hymenoptera) e *Deltabaculovirus* (nucleopoliedrovírus de Diptera) (Jehle et al., 2006). Sua replicação envolve a produção de dois fenótipos infectivos do vírion: Os BV (do inglês ‘*budded viruses*’) ou vírus extracelulares, ECV (do inglês ‘*extracellular virus*’) e; vírus derivado de oclusão, ODV (do inglês ‘*occlusion derived-virus*’) (Slack et al., 2007; van Oers 2011).

Diferentes espécies de baculovírus têm sido empregadas no controle biológico de pragas agrícolas e florestais (Ribeiro et al., 1998; Moscardi 1999). O maior programa de controle de pragas utilizando um bioinseticida viral realizado no Brasil, onde o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) é empregado no controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Moscardi et al., 2011). Porém, nos últimos anos a aplicação de AgMNPV vem diminuindo devido ao modo de ação lenta do biopesticida (tempo de morte de 4 - 14 dias) e, principalmente, pelo aumento na ocorrência de infestações duplas por *Anticarsia gemmatalis* e *Pseudoplusia includens*, a qual não é suscetível ao AgMNPV (Nava et al., 2010; Bueno et al., 2012). Estes problemas são comuns a vários outros programas de controle biológico que utilizam baculovírus, portanto, são necessárias ações que contribuam para o aumento da eficiência destes biopesticidas.

A aplicação mais importante dos baculovírus é como vetor viral para a expressão de proteínas heterólogas em células de inseto (O’Reilly et al., 1992). Entre os diferentes vetores os baculovírus são os vírus mais utilizados como vetores de expressão de proteínas eucarióticas (O’Reilly et al., 1992; Luckow et al., 1993; Pijlman et al., 2002), pois, são seguros e possuem promotores fortes como os promotores dos genes *p10* e *poliedrina*, responsáveis pela alta quantidade de expressão de proteínas recombinantes

em células de inseto. As proteínas recombinantes produzidas a partir da infecção dos baculovírus recombinantes tem processamento pós-traducional de uma célula eucariótica, portanto, são, na sua maioria, biologicamente ativas (Ribeiro et al., 2015).

Desde a introdução do sistema expressão baseados em baculovírus (BEV) em células de inseto, vetores de transferência de um único gene, genes múltiplos e expressão de gene de fusão foram desenvolvidos em sua maioria por recombinação homóloga. O gene de interesse é flanqueado por sequências homólogas a região alvo de recombinação no genoma viral e é introduzido juntamente com o DNA do vírus em células de inseto, onde ocorre a recombinação homóloga. Essa metodologia é pouco eficiente e muito trabalhosa, podendo levar mais de um mês para a construção de um vírus recombinante. Em contraste, a transposição sítio-específica é uma estratégia eficiente para construção de baculovírus recombinantes, pois reduz o tempo de construção de baculovírus recombinantes para 7-10 dias. Esta abordagem foi desenvolvida por Luckow et al. (1993) e está disponível comercialmente para o baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Manual Bac-To-Bac Baculovirus).

Neste contexto, a construção de um novo vetor de expressão baseado no *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) pelo sistema de transposição sítio-específica facilitará a manipulação do genoma desse vírus e permitirá a expressão de proteínas heteróloga de interesse biotecnológico e/ou científico, promovendo a produção de bioinseticidas recombinantes e estudos funcionais de genes virais. Além disso, o desenvolvimento de sistemas de expressão baseados em outros vírus pode ser importante para fins comparativos e para permitir opções de sistemas de expressão de genes heterólogos.

1.1 Baculovírus

A família *Baculoviridae* compreende vírus capazes de infectar insetos das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Díptera (Miller, 1997; Jehle et al., 2006) e são amplamente utilizados como bioinseticida para o controle biológico de insetos da ordem Lepidoptera (Castro et al., 2006).

O ácido nucleico que forma o genoma dos baculovírus é circular e possui DNA fita dupla, com cerca de 80-180 kb, podendo codificar de 100 a 200 proteínas (Theilmann et al, 2005). O DNA está envolto por um capsídeo proteico (nucleocapsídeo) de 30-60 nm × 250-300 nm, a unidade infectiva do vírus (vírion) (Jehle et al., 2006). Os nucleocapsídeos estão envoltos por uma membrana e são ocluídos em uma matriz proteica denominada corpo de oclusão (OB do inglês *occlusion body*). Os Nucleopolyhedrovirus (NPV) são baculovirus que possuem OBs podendo variar o tamanho da estrutura de 0,15 a 15 µm sendo montado no núcleo da célula infectada. Sua principal proteína é chamada poliedrina, podendo conter muitos vírions. Os Granulovirus (GV) são baculovirus caracterizados por possuírem pequenos OBs, frequentemente ovóides de 0,3 a 0,5 µm de tamanho, que normalmente contém um único vírion e sua proteína principal é a granulina. Os OBs dos granulovírus são produzidos tanto no núcleo quanto no citoplasma da célula infectada (Bilimoria 1991; O'Reilly et al., 1992; Funk et al., 1997; Jehle et al., 2006).

1.2 Fenótipos virais

Uma das características marcantes dos baculovírus é possuir dois fenótipos distintos durante seu ciclo de infecção (Figura 33). Os vírus derivados da oclusão - ODVs (do inglês, *occlusion derived virus*) e os vírus extracelulares - ECV (do inglês, *Extracellular Viruses*) ou vírus brotados - BV (do inglês, *budded virus*). Os BVs são gerados por brotamento do nucleocapsídeo da membrana plasmática celular e não se encontram oclusos em um OB. Os ODVs disseminam a infecção via oral entre os insetos e estão presentes oclusos nos OBs. Os BVs, disseminam a infecção de célula a célula dentro do corpo do inseto e os ODVs infectam as células do intestino médio (Rohrmann 2011). No entanto, o genoma e a composição proteica dos BVs e ODVs são as mesmas, mas são diferentes fenotipicamente (Blissard, 1996).

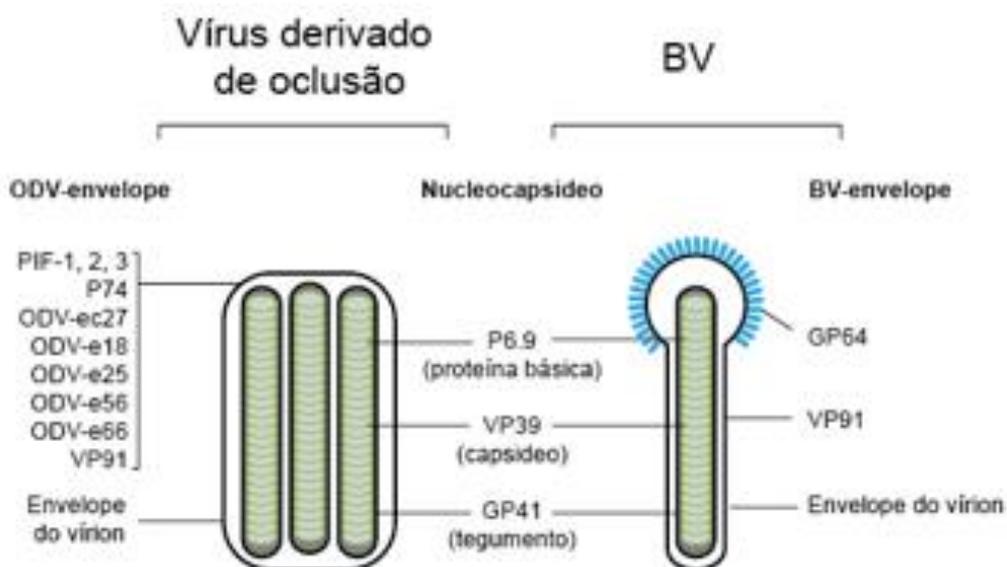


Figura 33: Fenótipos de baculovírus maduros produzidos durante o ciclo de infecção. A figura mostra as partículas ODVs e BVs que são diferentes fenotipicamente, mas que possuem o mesmo genoma. Os vírus derivados da oclusão (ODV) são mostrados com o nome das principais proteínas de membrana e vírus brotados da célula (BV), com projeções denominadas peplômeros, (contendo a glicoproteína GP64) importante para a entrada do vírus na célula por endocitose adsorptiva e outras proteínas de superfície.

Nos estágios finais da infecção de células de inseto por baculovírus, duas proteínas, a poliedrina (POLH), que forma a matriz proteica que envolve o OB e a proteína de 10 kDa, denominada de P10, responsável pela formação das estruturas fibulares no núcleo e citoplasma das células infectadas são produzidas em grande quantidade. Estas proteínas não são requisitadas para a infecção em culturas de células, assim, os genes dessas proteínas podem ser deletados do genoma viral. Os seus promotores são considerados fortes, por produzirem elevada quantidade de RNA mensageiro e conseqüentemente de proteínas e, portanto, são usados para a expressão de genes heterólogos no sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto (BEV). Quando na construção do vírus recombinante, a inserção do gene heterólogo é no lugar do gene *polh*, obtém-se vírus sem OBs (vírus não-occlusos, também denominados de occ-) (Rohrmann, 2011).

Os ODVs podem conter apenas um nucleocapsídeo por vírion (*Single Nucleopolyhedrovirus*-SNPV) ou vários nucleocapsídeos por vírion (*Multiple nucleopolyhedrovirus*-MNPV), dependendo da espécie viral (Volkman et al., 1977; O'Reilly et al., 1992) (Figura 34). Os GVs são geralmente SNPV, ou raramente possuem

dois ou três vírions no interior do corpo de oclusão (Federici, 1997).

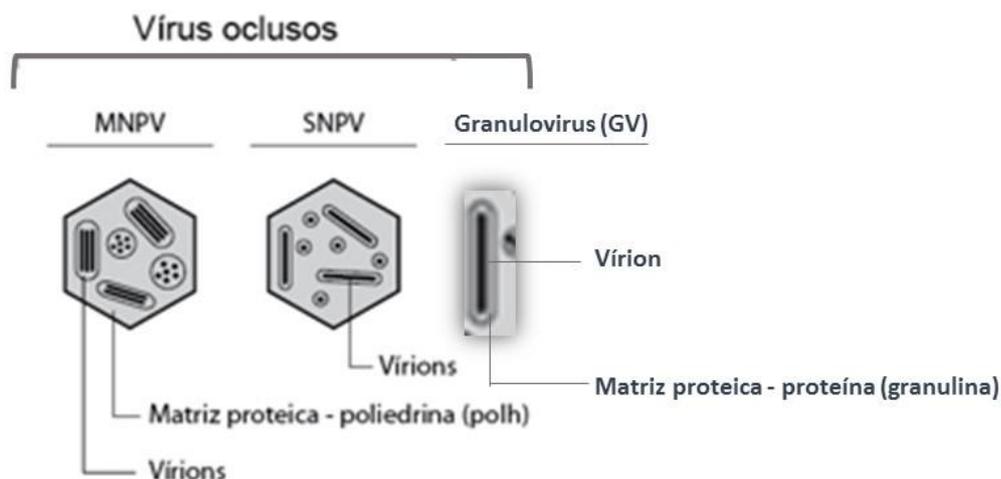


Figura 34: Tipos de corpos de oclusão dos baculovirus. Esquema dos fenótipos infectivos dos corpos de oclusão dos baculovirus. Durante uma infecção por baculovírus, as proteínas POLH e Granulina formam a matriz do corpo de oclusão. Os ODVs, para os NPVs podem apresentar corpos de oclusão com somente um nucleocapsídeo por envelope, denominado *single* (SNPV), ou vários nucleocapsídeos, denominado *multiple* (MNPV). Já os GV costumam apresentar somente um vírion por envelope.

1.3 Taxonomia

A família *Baculoviridae* é dividida em quatro gêneros. *Alphabaculovirus*, NPVs que infectam lepidópteros; *Betabaculovirus*, GVs que infectam lepidópteros; *Gammabaculovirus*, NPVs que infectam himenópteros e *Deltabaculovirus*, NPVs que infectam dípteros (Jehle et al., 2006). O gênero *Alphabaculovirus* é subdividido em grupo I e grupo II. A glicoproteína do envelope na superfície do BV, talvez seja específica para cada grupo desse gênero. No grupo I, a proteína GP64 está presente na superfície da partícula viral BV, em projeções de peplômeros, responsável pela entrada na célula do hospedeiro da partícula viral, por endocitose mediada por receptor. No grupo II dos *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus* e *Deltabaculovirus*, esta função é desenvolvida pela proteína F. No grupo I de NPV foi observado um homólogo de proteína F (Ac23) que ajuda a entrada da partícula viral na célula. Para o *Gammabaculovirus* não foi identificado ainda proteína específica de fusão (Volkman et al., 1985; Pearson et al., 2002). Recentemente, foi identificado um gene homólogo ao gene da proteína GP64, que até o momento estava presente apenas em *Alphabaculovirus* do grupo I, no genoma de um *Betabaculovirus*, o *Diatraea saccharalis granulovirus* (DisaGV) (Ardisson-Araújo et al.,

2015; Ardisson-Araújo et al., 2016). Além disso, esse gene foi inserido em no genoma de um *Alphabaculovirus* do grupo I (AcMNPV) defectivo para o gene *gp64* e mostrou ser funcional (Ardisson-Araújo et al., 2015).

1.4 Ciclo de infecção

A via mais importante de infecção para os baculovírus nos insetos hospedeiros é pela ingestão de alimentos contendo OBs em sua superfície. A dissolução dos corpos de oclusão se dá na luz do intestino médio de seu hospedeiro devido ao pH alcalino (pH 10 a 11) deste ambiente (Volkman 1977; Horton & Burand, 1993). Os ODVs liberados da dissolução dos poliedros atravessam a membrana peritrófica do intestino que apresenta quitina e glicoprotéínas em sua constituição e é acelular. Esta membrana serve como uma barreira impedindo a entrada de resíduos, contato direto das partículas dos alimentos e defesa contra infecções por vírus, fungos e bactéria. O envelope dos nucleocapsídeos se funde às microvilosidades da célula colunar do intestino médio, onde ocorre a entrada do capsídeo viral na célula. (Federici, 1997; Slack, et al., 2007) (Figura: 35).

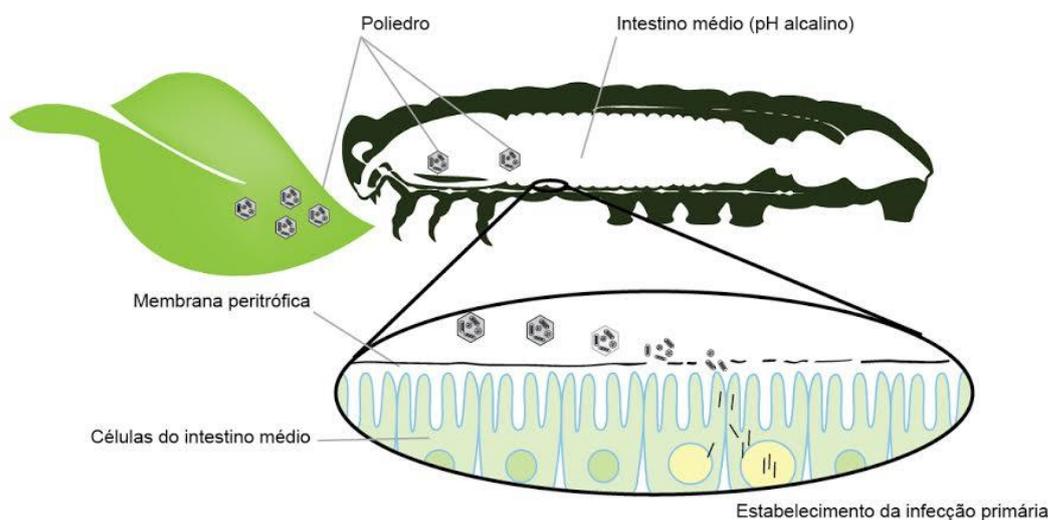


Figura 35: Esquema da infecção de uma larva de lepidóptera por baculovírus. A figura mostra a superfície de uma folha contendo corpos de oclusão (OB). Os OBs são ingeridos pela larva e atingem o intestino médio, que, por sua vez, possui um pH alcalino. As partículas virais são liberadas com a dissolução dos OBs, que, então, se ligam às microvilosidades das células do intestino e o envelope viral se funde à membrana plasmática das células. As células colunares são infectadas inicialmente, e, em seguida, outros tipos celulares, como traqueócitos e hemócitos. Ocorre a replicação dos vírus em diferentes tecidos do inseto hospedeiro.

Para que aconteça o estabelecimento da infecção é necessário que os nucleocapsídeos cheguem ao núcleo da célula e em seguida a liberação do material genético (DNA) para o núcleo da célula. A transcrição viral é efetuada usando a máquina da célula do hospedeiro. Ao fim da infecção primária, dá-se início a infecção secundária com a liberação de novos BVs das células colunares para outros tecidos do inseto. As partículas virais também podem ser direcionadas para as células da traquéia ou atingirem a hemolinfa (Volkman et al., 1977).

A infecção sistêmica, também chamada de infecção secundária, ocorre com a produção de BVs e disseminação da infecção por toda a parte do corpo do inseto. A partir do sistema circulatório e respiratório, causando a morte do inseto (Rohrman, 2011).

O inseto infectado por baculovírus apresenta mudanças morfológica e no comportamento. O baculovírus multiplica-se em diferentes tecidos do inseto, portanto, a partir do terceiro ou quarto dia de ingestão dos poliedros começa a manifestações dos sintomas de infecção: redução da alimentação; atraso no crescimento; flacidez do tecido e descoloração da epiderme. A característica diferencial da infecção por baculovírus no inseto é geotropismo negativo, ocorre a migração das larvas para o topo da planta hospedeira e morte no quinto dia após a infecção (Moscardi, 1999; Castro et al., 2006). As enzimas quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*), produzidas no final do ciclo de infecção, de vários baculovírus. Resultam na liquefação dos tecidos dos insetos (Figura 36). Essas enzimas causam a ruptura da cutícula do inseto, liberando os poliedros no ambiente (Miller, 1997; Rohrman, 2011).



Figura 36: Liquefação do tegumento do inseto no final da infecção por baculovirus. Larvas de *Spodoptera frugiperda* infectada pelo baculovírus AcMNPV que possui os genes *chiA/v-cath*. A seta vermelha indica o corpo liquefeito e a cutícula melanizada (Lima et al., 2013).

1.5 Expressão gênica em baculovírus

O processo de infecção inicia-se ordenadamente e sucessivamente. Ocorre o

controle da expressão gênica pela transcrição temporal dos genes virais, onde os genes expressos em uma classe temporal regulam os genes expressos na fase seguinte. A expressão gênica pode ser didaticamente dividida em três estágios: precoce (*early*), tardio (*late*) e muito tardio (*very late*) (Blissard et al., 1990).

Nas duas primeiras fases, ocorre o desligamento da síntese de proteínas do hospedeiro e o recrutamento de toda máquina da célula para a produção de vírus. A fase '*early*' prepara a célula para iniciar a replicação viral e produção de BV (até 6 h p.i.). Quando a célula inicia a replicação viral, inicia-se a fase *late*. Esta fase ocorre entre 6 e 18 h.p.i. responsável pela produção do fenótipo da infecção sistêmica, os BVs. A partir das 18 h.p.i., ocorre a expressão de genes relacionados à formação dos OBs. Esta fase é denominada *very late* e culmina na formação massiva dos OBs (Figura 37). Após 24 h. p.i., os ODVs, formados na zona em anel do estroma virogênico, são ocluídos nos OBs que são liberados através da ruptura da célula a partir de 48 h.p.i. (Slack et al., 2007).

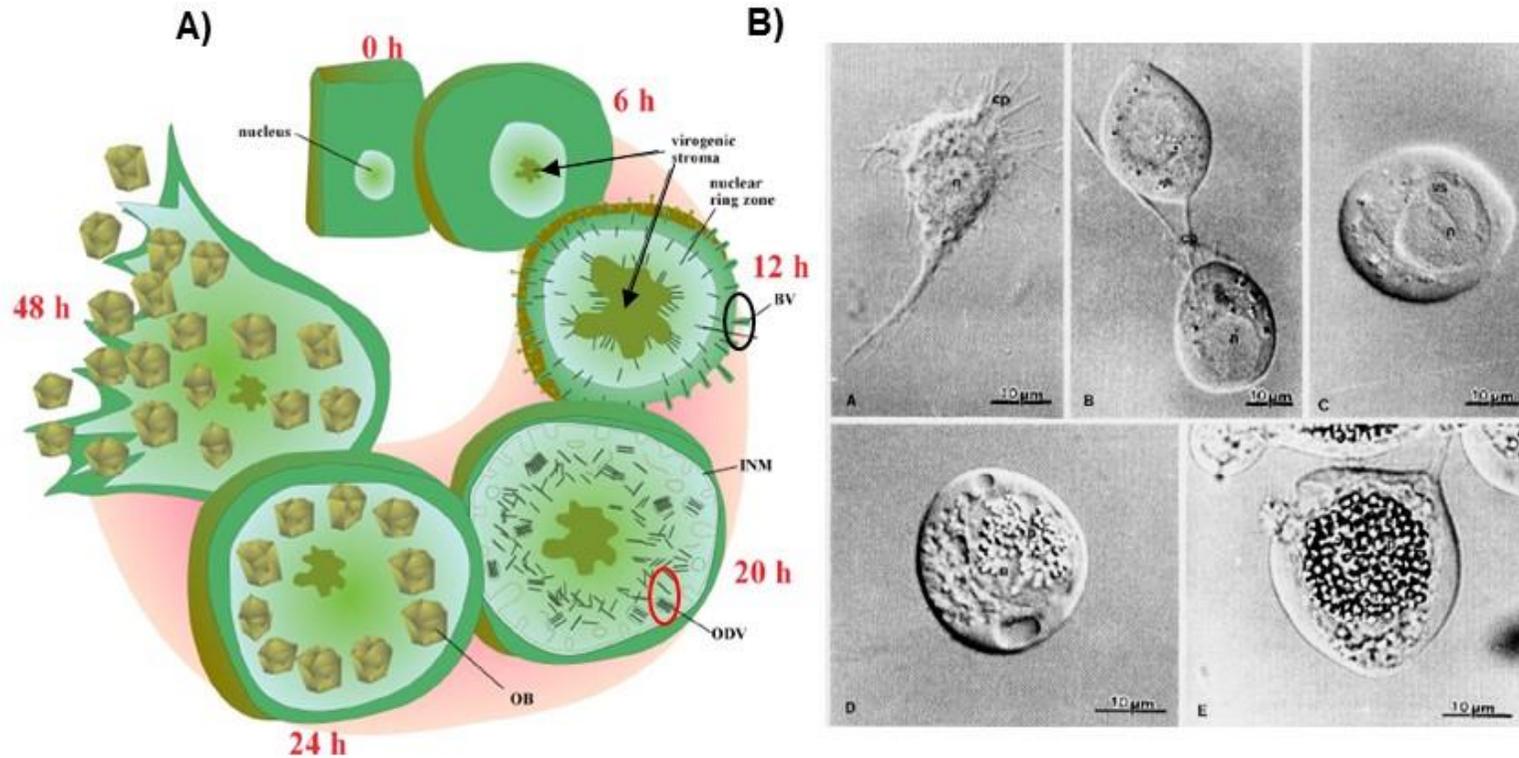


Figura 37: Alterações morfológicas de células de inseto ao longo da infecção por baculovírus. A) A infecção viral induz a alterações morfológicas durante a infecção devido à expressão temporal dos genes virais, que ocorre em três estágios: *early* (até 6 h p.i.); *late* (entre 6 e 18 h p.i.), com formação mais acentuada do estroma viral (seta preta) e a formação dos BVs (círculo pretos). A fase *very late* (a partir das 18 hp.i), ocorre a montagem de ODVs (círculo vermelho) e culmina com a formação massiva de OBs levando a lise celular (Slack, et al., 2007). B) Comparação *in vitro* com esquema de (A) em Micrografia de luz mostrando os efeitos citopáticos durante a infecção de células UFL-AG-286 por AgMNPV (Pombo et al., 1998)..

Os genes *p10* e *polh* estão envolvidos nesse processo de oclusão (Blissard et al., 1990; Lu et al., 1997). A poliedrina compreende mais de 95% de todas as proteínas virais na fase *very late*. Devido a sua alta produção, o *locus* da poliedrina é comumente utilizado para a construção de baculovírus recombinante como vetor de expressão (Kost et al., 2005).

1.6 *Anticarsia gemmatalis multile nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV)

O baculovírus, *Anticarsia gemmatalis multile nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) tem sido usado em alguns países da América do Sul em programas de controle biológico da lagarta da soja - *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Moscardi 1983; Ribeiro et al., 1998). No Brasil, o AgMNPV chegou a ser aplicado em 2.000.000 de hectares de soja (safra 2003/2004) e foi considerado o maior programa do mundo de controle biológico utilizando um vírus (Figura 38). O uso incorreto de inseticidas químicos, como por exemplo: fungicidas e herbicidas, desencadeou um desequilíbrio na população de insetos/organismos existentes na cultura da soja. O que resultou foi o surgimento de pragas consideradas secundárias que passaram a ser importantes como as lagartas (*Pseudoplusia includens*, *Spodoptera frugiperda*); mosca branca (*Bemisia tabaci*) e ácaros (Moscardi et al., 2011). Portanto, o tratamento fitossanitário mudou (Nava et al., 2010), conseqüentemente, com a especificidade do baculovírus AgMNPV é para a lagarta *A. gemmatalis* outros métodos de controle fitossanitários foram usados para controlar as pragas emergentes e o uso do AgMNPV foi reduzido (Simonato et al., 2014).



Figura 38: Larva de *Anticarsia gemmatilis* infectadas pelo baculovírus AgMNPV. A foto mostra uma lagarta morta com sintomas típicos de infecção por baculovírus: descoloração do tegumento e morte pendurada na parte superior da planta. (Foto: Dr. Daniel Sosa-Gómez, disponível em: www.agencia.cnptia.embrapa.br).

O genoma do isolado do AgMNPV 2D foi sequenciado em 2006 (Oliveira et al., 2006) e foi observado um genoma de 132.239 pares de bases (pb). Pela análise filogenética, AgMNPV pertence aos NPVs do grupo I do gênero *Alphabaculovirus*, possui 152 fases abertas de leitura (ORF) (Oliveira et al., 2006). O AgMNPV possui uma maior identidade de sequência e organização genômica com o vírus *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDefMNPV) e só é encontrado em infecções mistas com o *Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus* (CfMNPV). Uma peculiaridade do CfDefMNPV é que não é capaz de infectar larvas de *Choristoneura fumiferana* pela rota natural (infecção *per os*), mas, passa a causar infecção se injetado na hemolinfa do inseto hospedeiro (Lauzon et al., 2005).

Um dos fatores interessantes sobre o genoma viral do AgMNPV é a ausência dos genes quitinase (*v-chiA*) e catepsina (*v-cath*), porém, estão presentes nos genomas dos baculovírus CfDefNPV e AcMNPV (Oliveira et al., 2006). Lima et al. (2013) construíram um AgMNPV recombinante (vAgp2100Cf.v-*chiA*/v-*cath*), contendo os

genes *chiA* e *v-cath* do CfDefNPV capaz de induzir a liquefação após a morte no corpo de lagartas de *A. gemmatalis* infectadas comprovando a importância das proteínas quitinase e catepsina nesse processo. Interessante ressaltar, que a ausência desses genes no genoma do AgMNPV foi um dos fatores que favoreceu o maior programa de controle de pragas por vírus no Brasil, pela facilidade de manipulação dos cadáveres dos insetos para formulação do produto biológico.

O genoma da maioria dos baculovírus possuem regiões com múltiplas cópias de sequências em tandem, ricas em AT e com motivos palindrômicos, denominadas “regiões homólogas” (*homologous regions – hrs*). Sequências de *hrs* semelhantes as de AcMNPV foram encontrados em vários outros baculovírus, incluindo *Bombyx mori* NPV (Ahrens et al., 1996) e em AgMNPV foram observados nove (Oliveira et al., 2006). As *hrs* são apontadas como intensificadores (*enhancers*) da expressão de genes da fase *early* e como origens de replicação (*ori*) do genoma viral (Oliveira et al., 2006; Miele et al., 2011). O genoma de AgMNPV também possui oito genes *bro* (*bro-a, bro-b, bro-c, bro-d, bro-e, bro-f, bro-g* e *bro-h*), que formam uma família multigênica composta de ORFs repetidas. Estas ORFs são dispersas ao longo do genoma e podem influenciar na diversidade genômica por apresentarem estrutura propensa a recombinação entre genomas e causar heterogeneidade entre genótipos (Li et al., 2002; 2005; Zhang et al., 2005). Também foram identificados 37 genes conservados (*core genes*) em todos os genomas sequenciados da família *Baculoviridae* (Miele et al., 2011), geralmente usados na classificação taxonomia e estudos sobre a relação evolutiva.

1.7 Baculovírus como vetor de expressão - BEV

O sistema de expressão baseado em vetores de baculovírus (*baculovirus expression vector*, BEV) é utilizado, principalmente, para a expressão de proteínas eucarióticas, pois são seguros e possuem promotores fortes, como os dos genes *p10* e poliedrina (*polh*), responsáveis pelos níveis elevados de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto. Além disso, as proteínas recombinantes, expressas em células de inseto infectadas por baculovírus recombinantes são capazes de produzir proteínas, em sua maioria, biologicamente ativas e com processamento pós-traducional de uma célula eucariótica (Hunt et al., 2005). Sendo assim, a tecnologia BEV combina a autenticidade da proteína de organismos eucarióticos com a eficiência dos sistemas baseados em microorganismos (Ribeiro et al., 2015).

Os primeiros trabalhos que relataram o uso de baculovírus como vetor de expressão foram descritos por Smith et al. (1983) para expressão da proteína *beta interferon* em células de inseto infectadas por um baculovírus AcMNPV geneticamente modificado. Para tanto, foi utilizado o promotor da poliedrina (*polh*) do AcMNPV para comandar a expressão do gene heterólogo. Com o passar do tempo, milhares de proteínas de diferentes organismos foram expressas em células de inseto, utilizando BEV. Entre outras utilidades é empregado para produção de antígenos virais recombinantes, para diagnóstico e produção de vacinas (Yori et al., 2013; Max et al., 2001). Ribeiro et al. (2001) foram os primeiros a construir um vetor (denominado pAgGal) para construção de um AgMNPV recombinante.

A clássica forma de produzir baculovírus recombinantes é por meio de recombinação homóloga (Figura 39), pois esses vírus possuem genomas relativamente grandes para clonagem direta. A inserção de genes heterólogos via recombinação homóloga ocorre quando um vetor de transferência, contendo o gene de interesse e flanqueado por sequências homólogas a região alvo de transposição é introduzido juntamente com o DNA do vírus em células de inseto, sob o controle de promotores fortes (*p10* ou *polh*). Dentro da célula co-transfectada, com o DNA viral alvo mais o plasmídeo contendo o gene flanqueado, ocorre a troca do gene intacto pela sequência que contém o gene flanqueado numa eficiência de 0,1 a 1% (Yao et al., 2007). Entretanto, esse sistema é trabalhoso, pouco eficiente, e a obtenção de um vírus recombinante puro pode levar semanas (Ribeiro et al., 2001).

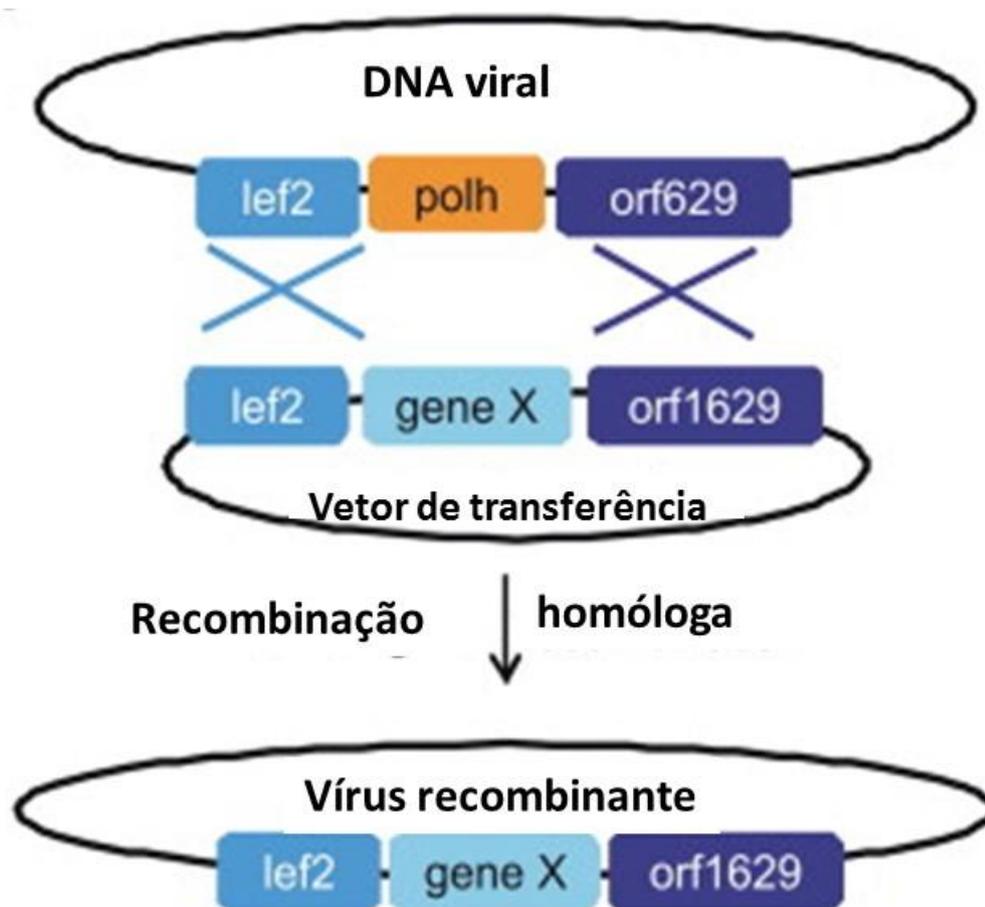


Figura 39: Diagrama ilustrativo da construção do baculovírus recombinante pelo método de recombinação homóloga. A figura apresenta o evento que ocorre entre as regiões flanqueadoras do gene exógeno, no vetor de transferência, e regiões homólogas no genoma de vírus. Resultando em um vírus recombinante com o gene de interesse.

Outra maneira de obtenção de baculovirus recombinante é via transposição sítio-específica em *E. coli*. A transposição sítio-específica é uma estratégia eficiente e reduz o tempo de construção de baculovírus recombinantes para 7-10 dias. Esta abordagem foi desenvolvida por Luckow et al. (1993), que construíram um plasmídeo recombinante grande, contendo o genoma do vírus AcMNPV, capaz de replicar-se em *E. coli*. O primeiro componente importante do sistema é o vetor pFastBac, no qual o gene de interesse é clonado. Dependendo do vetor escolhido, a expressão do gene de interesse é controlada pelo promotor do gene *polh* ou *p10* do vírus AcMNPV. Este cassete de expressão é flanqueado por braços mini-Tn7 (Tn7R e Tn7L) e também contém um gene que confere resistência à gentamicina e um sinal de poliadenilação do vírus SV40. O segundo componente importante do sistema é a linhagem de *E. coli* DH10Bac, que contém o genoma completo do baculovírus AcMNPV na forma de um plasmídeo

(também denominado de bacmídeo). O bacmídeo contém o replicon mini-F de baixo número de cópias, um gene de resistência à canamicina e um segmento de DNA que codifica o peptídeo *LacZ α* do vetor de clonagem pUC (New England Biolabs), dentro do qual o sítio de ligação para o transposon bacteriano Tn7 (*mini-attTn7*) está inserido. Além disso, a cepa de *E. coli* possui também mais um plasmídeo “*helper*”, o qual confere resistência à tetraciclina e codifica a enzima transposase. A região do plasmídeo de transferência, contendo o gene heterólogo flanqueada pelas regiões Tn7L e Tn7R, é inserida na bactéria contendo o bacmídeo (DH10Bac) e, pela ação da transposase, “salta” para a região *mini- attTn7* do bacmídeo (Luckow et al., 1993) e interrompe o gene *lac-Z* (β -galactosidase) (O’Reilly et al., 1992; Possee et al., 1997), conferindo uma coloração branca às colônias com o plasmídeo recombinante quando cultivadas em meio com indutor de cor azul X- gal/IPTG, na presença da enzima LAC-Z (Figura 40). Como o DNA do baculovírus AcMNPV é capaz de iniciar infecção viral em células de inseto (Kitts et al., 1990), o recombinante é usado para transfectar células de inseto (Manual Bac-To-Bac Baculovirus; Luckow et al., 1993; Yao et al., 2007).

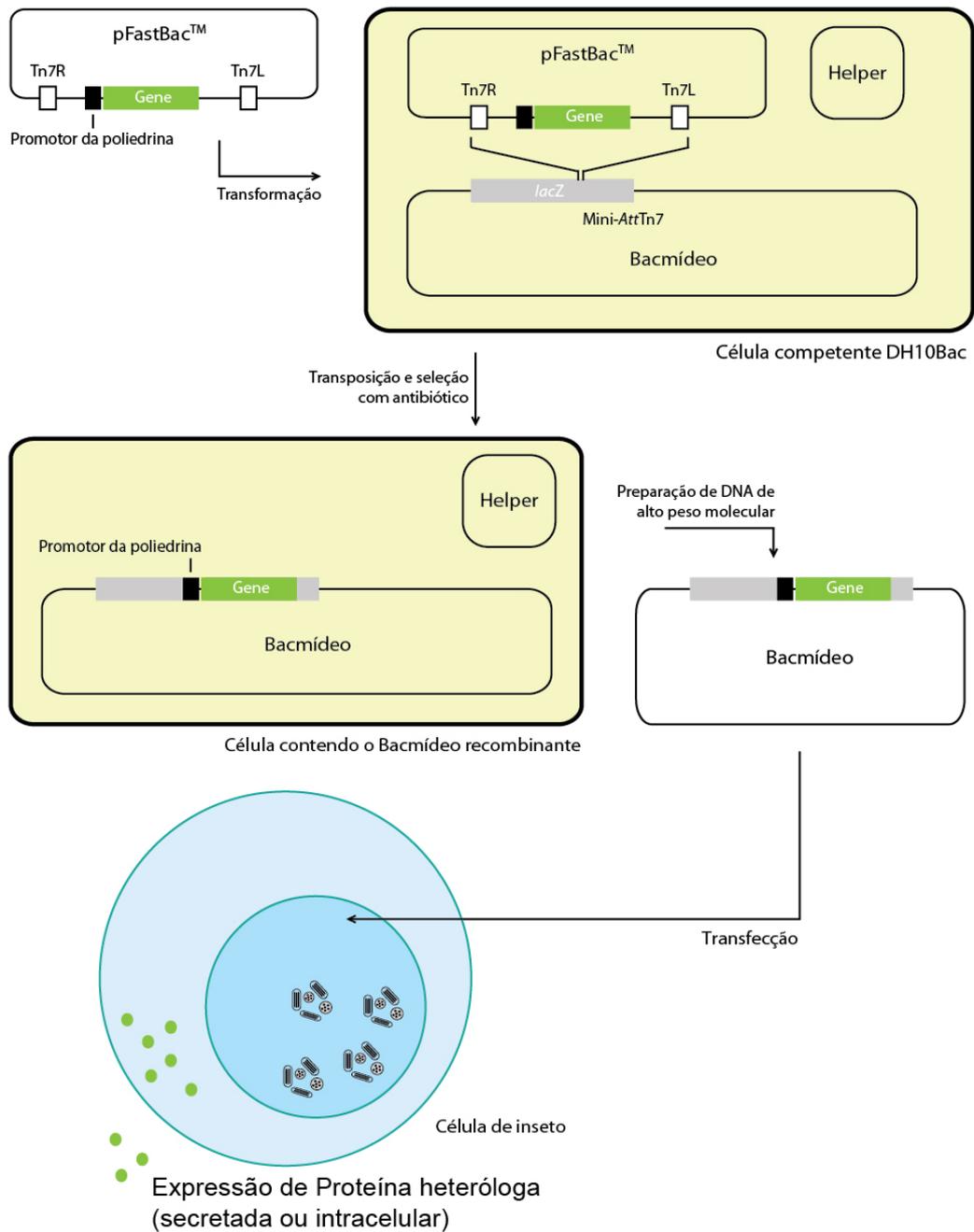


Figura 40: Diagrama da construção de um baculovirus recombinante usando o sistema de transposição sítio-específica em *E. coli*. O plasmídeo doador é incorporado à bactéria por transformação. Dentro da bactéria, o plasmídeo *helper* (pMON7124) produz uma transposase que insere a região flanqueada pelas sequências Tn7R e Tn7L (presente no vetor doador) dentro do sítio *mini-attTn7* presente no bacmídeo, interrompendo o peptídeo *lacZa*. A bactéria que sofreu transposição é selecionada por antibiótico e por coloração de colônia (*lacZ*). Extração do DNA do bacmídeo. Transfecção de células de inseto com DNA do bacmídeo recombinante. Como DNA viral é capaz de iniciar uma infecção, ocorre a produção de novos vírus e da proteína heteróloga.

A etapa crucial no desenvolvimento desta tecnologia para outros baculovírus implica a transformação do genoma viral em bacmídeo, e até o momento apenas alguns bacmídeos foram construídos com sucesso. Na tabela abaixo, observamos alguns bacmídeos que foram construídos nos últimos anos e estão sendo empregados na expressão heteróloga de proteínas de interesse biotecnológico e/ou científico de forma rápida e eficiente (Tabela 12).

Tabela 12: Espécies de baculovírus modificados geneticamente para construção de bacmídeos em *E. coli*. Todos os vírus, com exceção de *Cydia pomonella granulovirus* (*Betabaculovirus*), pertencem ao gênero *Alphabaculovirus*. Apenas vetores baseados no AcMNPV estão disponíveis comercialmente

Baculovírus	Gênero	Referências
<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>		Luckow et al. (1993)
<i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i>	<i>Alphabaculovirus</i>	Motohashi et al. (2005), Cao et al. (2006), Ono et al. (2007), Xiang et al. (2010)
<i>Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus</i>		Wang et al. (2003)
<i>Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus</i>		Pijlman et al. (2002), Yang et al., (2003)
<i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i>		Simón et al. (2008)
<i>Cydia pomonella granulovirus</i>	<i>Betabaculovirus</i>	Hilton et al. (2008)

2 Justificativa

O sistema expressão baseado em baculovírus e células de inseto (BEV), pode ser construído pela manipulação do genoma de um baculovírus qualquer por: (i) recombinação homóloga em células de insetos ou (ii) transposição sítio-específica em *E. coli* (bacmídeo). O processo comum é de recombinação homóloga, que utiliza um vetor de transferência, mas, é um sistema trabalhoso, pouco eficiente e a obtenção de um vírus recombinante puro pode levar semanas (Ribeiro et al., 1998). Em contraste, a transposição sítio-específica é uma estratégia eficiente e reduz o tempo de construção de baculovírus recombinantes para até sete dias. Esta abordagem foi desenvolvida e está disponível comercialmente para o baculovírus AcMNPV (Manual Bac-To-Bac Baculovirus), o qual constitui um dos mais importantes sistemas eucarióticos de expressão heteróloga de proteínas (van Oers, 2011). Contudo, vetores baseados em outros baculovírus têm tornado-se uma alternativa ao sistema de expressão baseado em AcMNPV. O bacmídeo de *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (Motohashi et al., 2005), por exemplo, tem sido intensamente utilizado na expressão heteróloga de proteínas em lagartas do bicho-da-seda. Dessa forma, o desenvolvimento de novo sistema de expressão baseados no genoma de AgMNPV é importante para fins comparativos, construção de vírus recombinantes, estudos funcionais de seus genes ou simplesmente para permitir alternativas economicamente mais acessíveis.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Construir novos vetores de expressão baseados no genoma de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) pela metodologia de recombinação sítio-específica.

3.2 Objetivos específicos

- Construir um bacmídeo derivado de AgMNPV;
- Construir vírus recombinante usando diferentes plasmídeos de transferência;
- Expressar proteínas heterólogas em células de inseto em cultura (*in vitro*) e em insetos (*in vivo*);
- Comparar a expressão das proteínas recombinantes com outros sistemas.

4 Materiais e métodos

4.1 Linhagens celulares de inseto utilizadas

As linhagens celulares, derivadas de insetos, utilizadas no presente trabalho foram: células provenientes de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) (Sieburth et al., 1988) e de células BTI-Tn-5B1- 4 (*High five* ou Tn5B) derivada de *Tricoplusia ni* (Granados, et al., 1994). As linhagens foram utilizadas para infecção com vírus selvagens e recombinantes. As células foram mantidas em meio TC-100 (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino a 27°C.

4.2 Vírus

Os vírus utilizados no presente trabalho foram o AgMNPV 2D (Johnson, et al., Maruniak, 1989, Oliveira, et al., 2006) e o vírus recombinante vAgGalA2 (occ⁻), um vírus derivado do AgMNPV-2D, que possui o gene *polh* deletado e em seu lugar foi inserido um cassete contendo os promotores *gpt* (guanine-hypoxanthine phosphoribosyltransferase) de *E. coli* e *hsp70* de *Drosophila melanogaster* e o gene *β -galactosidase*. A ORF do gene da *polh* foi interrompida pela inserção do gene, porém o promotor da poliedrina foi mantido a jusante do gene. Dessa forma, o vAgGal quando infecta células de inseto não produz poliedros e as células infectadas adquire a cor azul na presença do substrato X-gal no meio de cultura (Ribeiro et al., 2001).

4.2.1 Amplificação de partículas BV *in vitro*

Os BVs dos diferentes vírus utilizados neste trabalho foram amplificados *in vitro* utilizando células Tn5B seguindo protocolo de O'Reilly et al. (1992), mantidas em meio TC100 (GIBCO-BRL). Foram inoculadas com 1 mL de um estoque viral não titulado e incubadas a 27°C. Depois de 7-10 dias foi confirmada a infecção, no caso do vAgGalA2 na presença de X-gal [20 µg/mL] (2µL/ frasco) e para AgMNPV-2D presença de poliedros.

4.2.2 Extração de DNA a partir de partículas BV

Partículas BV de vAgGal-2 foram submetidas à extração de DNA de acordo com O'Reilly et al. (1992). Foram colocados 30 mL (~10⁸ pfu/mL) do sobrenadante de células

infectadas (estoque viral) em tubos de centrífuga (Polyallomer 25 x 82 mm - Beckman) e no fundo de cada tubo foram aplicados 3 mL de solução de sacarose 25% (Sacarose 25g; NaCl 5mM; EDTA 10mM). Os tubos foram submetidos à ultracentrifugação (Beckman, rotor SW28) a 80.000 x g 4°C / 75min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram acrescentados 200µL de tampão de lise celular (Tris-HCl 10mM, pH 7,6; EDTA 10mM, pH 8,0; SDS 0,25%) e 25µL de proteínase K (20mg/mL), incubando a amostra a 37° C / 16h. A amostra foi então submetida a ciclos de extração com o mesmo volume da amostra com fenol, fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado utilizando etanol absoluto (2,5x o volume inicial da amostra) com adição de NaAc 10% (3M; pH 5,2) e incubada a -20°C/16h. A amostra foi submetida à centrifugação por 12.000 x g / 30 min, lavada com a adição de 500µL de etanol 70% e novamente centrifugada como descrito acima. O sedimento resultante contendo o DNA, foi resuspenso em e água milliQ, para um volume final de 20 µL e armazenado a 4°C.

4.3 Bactérias

Foi utilizada a linhagem bacteriana de células *E.coli* DH10B (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells-Invitrogen™), para realizar a transformação e amplificação de plasmídeos. Para recombinação homóloga em bactéria foi usada *E. coli* cepa BJ5183 (Stratagene), que possui em seu genoma o gene *recA* mutado, o qual permite um aumento na taxa de recombinação homóloga nessa linhagem.

4.3.1 Plasmídeos utilizados

Os plasmídeos usados, sua construção e composição estão descritos na tabela abaixo (Tabela 13).

Tabela 13: Descrição dos plasmídeos usados para construção dos resultados.

Plasmídeos	Construção/Composição	Utilização	Referência
bMON14272 (136 kb)	Genoma completo do baculovírus AcMNPV denominado de bacmídeo. O bacmídeo contém o replicon mini-F de baixo número de cópias, um gene de resistência à canamicina e um segmento de DNA que codifica o peptídeo LacZ α do vetor de clonagem pUC (New England Biolabs), dentro do qual o sítio de ligação para o transposon bacteriano Tn7 (mini-attTn7) está inserido.	Amplificar e isolar o cassete KLM (contendo fragmento Mini-F replicon, uma origem de replicação para <i>E. coli</i> capaz de permitir a propagação do DNA do vírus em bactéria na forma de um grande plasmídeo; o gene repórter <i>lac-Z</i> α ; o sítio específico <i>attTn7</i> e o gene de resistência a canamicina-Kan)	(Manual Bac-To-Bac Baculovirus)
p2100, (2100 pb)	Possui sítio único para enzima de restrição <i>EcoRV</i> . Esse vetor foi construído no plasmídeo pGEM-T® (Promega). Foi inserido um sítio de restrição <i>EcoRV</i> na posição -161 em relação ao ATG no <i>locus</i> do gene de <i>polh</i> AgMNPV; Gene de resistência a <i>Amp</i> ; 2094 pb das regiões flangeadoras do gene <i>polh</i> de AgMNPV.	Clonagem do cassete KLM no sítio único <i>EcoRV</i>	Cordeiro et al., 2008
p2100-KLM (10.2 kb)	Cassete KLM inserido no sítio de restrição <i>EcoRV</i> .	Recombinação homóloga em célula de inseto. Transfecção (DNA AgMNPV e vetor)	Construído no presente trabalho
bMON 7124 (13.2 kb) <i>helper</i>	Plasmídeo <i>helper</i> , presente na cepa DH10Bac, resistente a tetraciclina foi multiplicada e em seguida realizada uma lise alcalina em pequena escala, DNA plasmidial foi resolvido em gel de agarose 0.8%, e eluição (fragmento esperado de 13.200 pb)	Produção de enzima transposase, que irá atuar na transposição (<i>in trans</i>) sítio específica dos fragmentos de interesse.	Barry, 1988

4.3.2 Extração de DNA plasmidial

Os plasmídeos foram submetidos à extração de DNA por lise alcalina em pequena escala de acordo Sambrook et al. (2001).

4.4 Amplificação do cassete KLM

O cassete KLM do plasmídeo bMON14272 (Manual Bac-To-Bac Baculovirus) foi amplificado por PCR gerando um fragmento de 8,6 kb, que corresponde ao tamanho esperado do KLM [contendo fragmento Mini-F replicon, uma origem de replicação para *E. coli* capaz de permitir a propagação do DNA do vírus em bactéria na forma de um grande plasmídeo; o gene repórter *lac-Z* α ; o sítio específico *attTn7* e o gene de resistência a canamicina (kan)]. Para esta amplificação os oligonucleotídeos foram desenhados e sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies), com sítios únicos de restrição *FseI* e *Bsu36I* flanqueado o fragmento amplificado (Figura 41A). Os oligonucleotídeos (KLM-F/R- *FseI*) possuem sítios para a enzima *FseI*, flanqueando a região KLM e o par oligonucleotídeos (KLMR_ *Bsu36I*-p10F/R) possuem sítios para a

enzima *Bsu36I* flanqueando a região KLM (Tabela 14 e 15). Este sítio (*Bsu36I*) está presente na porção 3' terminal do gene *p10* (Figura 41B) e desta forma os oligonucleotídeos foram desenhados de modo a permitir a reconstituição do gene *p10*, independentemente da orientação em que o fragmento KLM se insira (Figura 41C). Já o sítio *FseI* está localizado no gene *odve66* na posição 39.302 do genoma de do AgMNPV, onde será inserido o cassete KLM (41D) Nas Tabelas 14 e 15 também estão descritos oligonucleotídeos e condições das diferentes PCRs para amplificação e confirmação das diferentes construções.

Tabela 14: Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações das estratégias de clonagem e confirmação da inserção do KLM

Oligonucleotídeo	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')	Utilização
KLMF_ <i>Bsu36I</i> -p10	CCGACT <u>CCTGAGGTACCGGAAAT</u> CCCAGCACC CGGCGAAGCCGCAAGTAAGGAGCCACGGTTGAT GAGAGCTTTGTTGTAGG	Estratégia de clonagem do KLM
KLMR_ <i>Bsu36I</i> -p10	CCGACT <u>CCTGAGGTACCGGAAAT</u> CCCAGCACC CGGCGAAGCCGCAAGTAACGGATTTCCTTGAAG AGAGTGAGTTTTTTGG	
KLM-F	GTAGCAACGGTTAGGGCGAGTTGGGCGGAGCCCC CGGGCTGCAGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGC CTCGTG	Estratégia de clonagem do KLM
KLM-R	GTGATGGATGTGTTTTTTAGTCATTAACCCTTTCCA TCCAACGACAAGCTTCATCGTGTCGGGTTTAACAT TACGG	
KLM-F- <i>FseI</i>	<u>GGCCGGCC</u> **GGCGCGCCGAGCCACG	Estratégia de clonagem do KLM
KLM-R- <i>FseI</i>	<u>GGCCGGCC</u> **GGCGCGCCCGCATTTCTCT	
M13-F	GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Confirmação da clonagem do KLM
M13-R	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATT	
M2 F	GTCGACTTTCAGAGAGACGATGCCTGAGCC	Estratégia de clonagem e confirmação do KLM
M2 R	GAGCTCGGCCGGCCGGATTTCCTTGAAGAGAGTGAGT	
SphIF	GCATGCCGCTGTGCATGG	Estratégia de clonagem do KLM
PstIR	CTGCAGGGATTTTGGGTGTG	
PARPAgF	GGATCCATGTTTAGGCAAGCAAAGAG	Estratégia de clonagem do KLM Confirmação do genoma de AgMNPV
PARPAgR	GTCGACTTATTGTCAATTAATATCG	
CATHAc F	AGATCTATGAACAAAATTTGTTTTATTTGTTTGTGTAC GGCG	Controle negativo da PCR, para o possível vírus recombinante
CATHAc R (Lima, et al., 2013)	GGATCCAAATAGCGAGTGTGTTGAGATT	

(*)A região sublinhada correspondem aos sítios para a enzima *Bsu36I* e a região em negrito representa a sequência de reconstituição do gene *p10* de AgMNPV e *FseI***

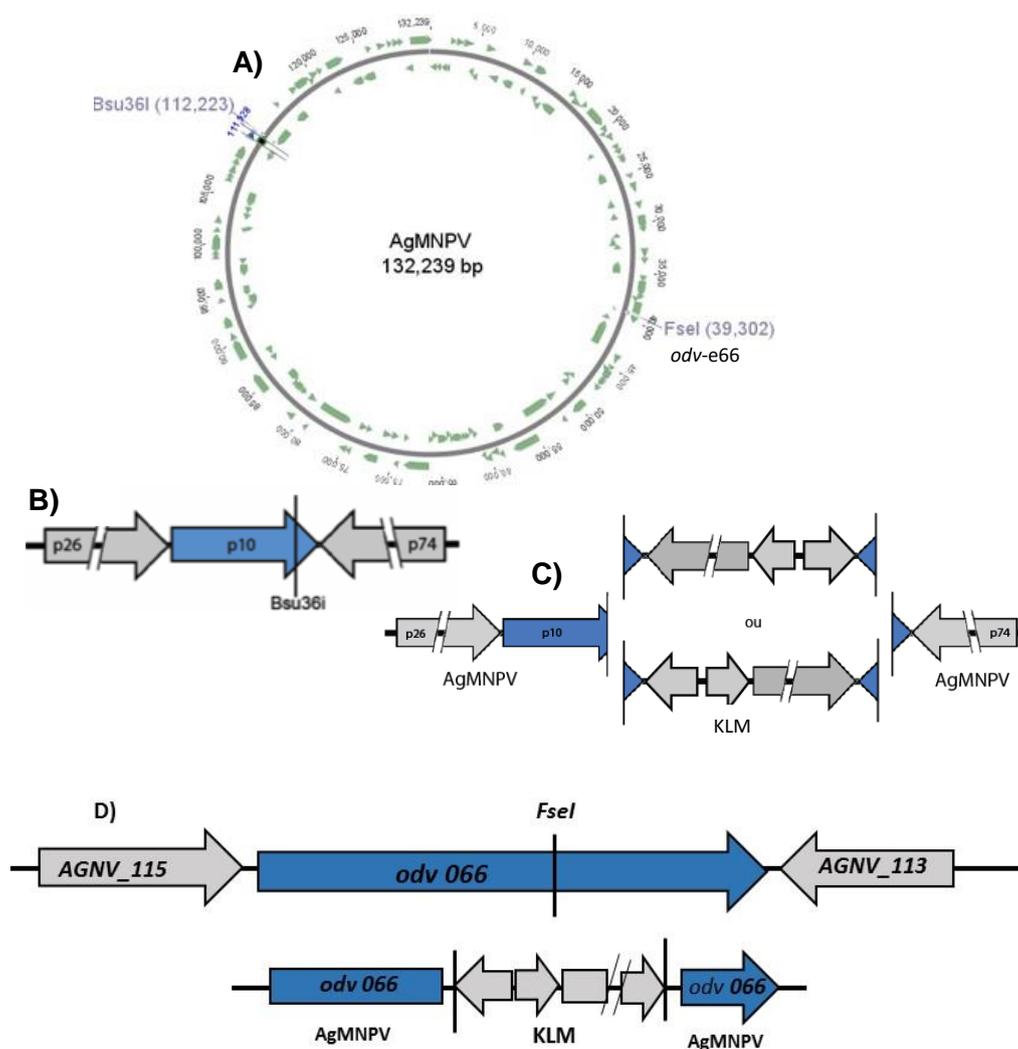


Figura 41: Diagrama do genoma circular do AgMNPV evidenciando sítio único. A) Esquema do genoma circular do AgMNPV evidenciando o sítio único de *Bsu36I* (posição 112.223) dentro da ORF do gene *p10* e *FseI* (posição 39.302) localizado dentro da ORF do gene *odv e66*. B) Detalhe da localização do sítio de *Bsu36I* na porção terminal do gene *p10*. C) Reconstituição do gene *p10* no bacmídeo do AgMNPV, independente da orientação do fragmento KLM. D) Detalhe da localização do sítio de *FseI* na ORF *odv e66* e a inserção do cassete KLM no sítio de *FseI* do AgMNPV.

A reação da PCR foi realizada utilizando o kit *LongAmp®Taq PCR* (New England BioLab) de acordo com as recomendações do fabricante. As condições da reação foram: 5 μ L de LongAmp Taq reaction Buffer 5X, 0,75 μ L de dNTP 10 mM, 1,0 μ L oligonucleotídeo *Forward* (10 μ M), 1,0 μ L oligonucleotídeo *Reverso* (10 μ M), 15 ng DNA template, 1,0 μ L (2,5 U) LongAmp Taq DNA Polymerase e H₂O milliQ q.s.p., para um volume final de 25,0 μ L. Foi utilizado para amplificação os programas descritos na Tabela 15 e uma extensão final de 65°C por 10 min. O mesmo protocolo para reação de amplificação foram usados para todas as estratégias de clonagem do cassete KLM.

Tabela 15: Programas utilizados para cada par de oligonucleotídeos, na amplificação do fragmento relativo ao cassete KLM e para confirmação do vírus recombinante de AgMNPV

Programa	Desnaturação 1 min.	Anelamento 1min.	Polimerização 50 seg / kb.	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
KLMF_Bsu36i-p10/R		58° C			8.600
KLM-F/R		60° C			8.600
KLM-F-FseI/R		58° C			8.600
M13-F/R	94° C	60° C	65° C	35	700
M2 F/R		60° C			2.930
SphIF PstIR		55° C			10.612
PARPAgF/R		55° C			1.200
CATHAc F/R		58° C			1000

4.5 Construção e confirmação do plasmídeo p2100-KLM

Após a confirmação da amplificação do cassete KLM, o fragmento foi purificado com o kit Quiagen (QIAEX® II-Gel Extraction Kit) de acordo com as especificações do fabricante, para remoção de oligonucleotídeos, dNTPs e DNA molde restantes da reação de PCR. Em seguida, quantificado por espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000).

O plasmídeo p2100 (Figura 42A) foi digerido com enzima de restrição *EcoRV* (“*Blunt-end*”). Para essa reação foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial, 5 U da enzima *EcoRV* (Promega®), tampão da enzima (Promega®) diluído 10 x e H₂O milliQ q.s.p. Para aumentar a eficiência de ligação o plasmídeo foi tratado a enzima *Taq* DNA polimerase e dTTP. A atividade de transferase terminal da *Taq* DNA polimerases, adiciona um desoxirribonucleotídeo à extremidade 5' (5'-T) de um substrato de DNA de extremidades não coesivas para evitar a autoligação e otimizar a reação de ligação. Nessa reação foi usada 1U de *Taq* DNA polimerase (Go Taq® Green – Master Mix, 2X Promega®) e 10mM de dTTP (Promega®) em volume final de 20µL. Incubada a 72°C por 15min. Depois foi purificado com kit (o kit Quiagen (QIAEX® II-Gel Extraction Kit).

Este fragmento tratado e purificado foi usado em uma reação de ligação com o cassete amplificado por PCR e purificado. Para essa reação foi utilizando a enzima T4 DNA Ligase (1U/µl.-Promega®) de acordo com o recomendado pelo fabricante. Esta ligação gerou o plasmídeo fechado p2100-KLM com o cassete KLM flanqueado com fragmento do genoma de AgMNPV e promotor da *polh* AgMNPV (Figura 42B). Para esta reação foi utilizado 50 ng de DNA plasmidial, 100 ng do inserto (KLM produto da

PCR), 1U da enzima T4 DNA Ligase (Promega®), tampão específico da enzima diluído 10 x e H₂O milliQ q.s.p., para um volume final de 10 µl. A reação foi incubada à temperatura de 4° C por 12h e após esse período a enzima foi inativada por 10 min / 65° C. Essa reação foi utilizada para transformação em células de *E.coli* DH10B (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells-Invitrogen™), eletrocompetentes. O plasmídeo foi transformado por eletroporação, utilizando o eletroporador Bio-Rad MicroPulser™, seguindo instruções do fabricante.

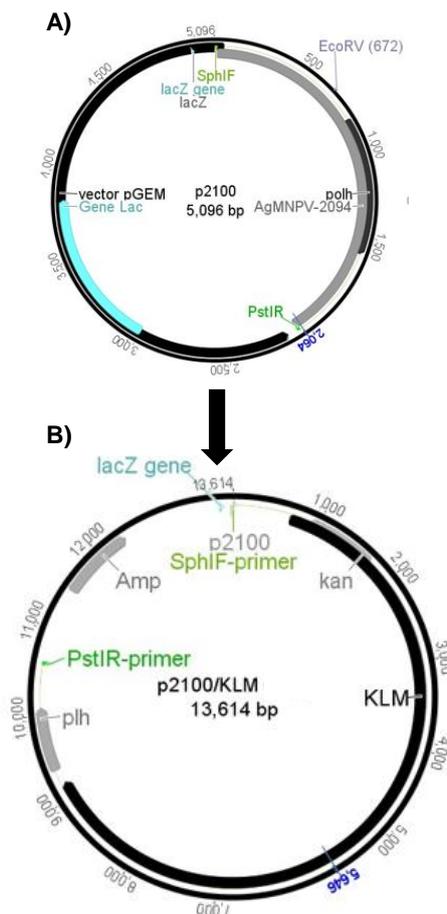


Figura 42: Diagramas dos plasmídeos p2100 e p2100-KLM A) Plasmídeo p2100 (Cordeiro, et al., 2008), o esquema mostra a posição do sítio de restrição para a enzima *EcoRV* (posição 672); promotor do gene *polh*, (posição 830-1.587); gene de resistência à ampicilina, *Amp* (posição 830-1.587; 2094 região do locus do gene *polh* (posição 1-2.094); *SphIF* e *PstIR* representam a posição de oligonucleotídeos usados para amplificação da região de 2.094 pb; *Lac* gene = βgalactosidase (posição 2.965- 3.895). B) Mapa do p2100-KLM (13.614 pb), mostrando a posição do fragmento KLM amplificado por PCR e inserido no sítio único de *EcoRV* do p2100, com o gene da poliedrina, e as regiões de recombinação homóloga que serão utilizadas na construção do vírus do recombinante.

A seleção dos clones foi feita em meio LB-ágar seletivo (canamicina Sigma-Aldrich®), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) 20 µg/mL (Promega®), IPTG (*isopropyl thiogalactoside*) 40 µg/mL (Sigma-Aldrich®) e todas as

colônias azuladas foram isoladas para avaliação da presença do cassete KLM. Os plasmídeos obtidos foram confirmados por clivagem com enzimas de restrição: *Pst*I/*Bsu*36I e *Eco*RI para confirmação da construção do plasmídeo p2100-KLM.

4.6 Construção do vírus recombinante AgMNPV com o fragmento KLM (vAgMNPV-KLM)

4.6.1 Estratégia de recombinação homóloga em células de insetos

Após clonagem do cassete KLM, o vírus recombinante vAgMNPV-KLM foi construído por recombinação homóloga em células de insetos. A recombinação ocorre entre o vetor de transferência (p2100-KLM), com regiões mediadoras da recombinação homóloga entre o vetor de transporte, que correspondem o flanco esquerdo e direito do gene da poliedrina de AgMNPV com 670 e 576 nt, respectivamente, e o DNA genômico do vAgGalA2.

4.6.1.1 Co-transfecção em células UFL-AG-286 e/ou Tn-5BI- 4

O plasmídeo p2100-KLM foi cotransfectado com o DNA do vírus recombinante vAgGalA2 em cultura de células UFL-AG-286 e/ou Tn-5BI- 4 com 1 µg de DNA dos plasmídeos e 0,5 µg do DNA do vírus recombinante vAgGalA2 utilizando uma solução de lipossomos (*FuGENE® Transfection Reagents-Promega*). Uma placa de 35 mm de diâmetro foi previamente preparada com células de inseto (1×10^6 células) e incubada por 1 h. para aderência das células. Em seguida, os DNAs plasmidial e viral foram diluídos em 250 µL de meio TC-100 sem soro em uma placa de poliestireno e em separado, 8 µL de lipossomos foram diluídos em 250 µL de meio TC-100 sem soro. Posteriormente, misturado e incubados por 30 min à temperatura ambiente. Após esse período, a mistura foi adicionada em cultura de células com TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram incubadas a 27°C. Sete dias após a co-transfecção, o sobrenadante das células transfectadas foi usado para isolar o baculovírus AgMNPV recombinante (vAgMNPV-KLM) pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços, como descrito por O'Reilly et al. (1992). Sete ciclos de isolamento em placa de 96 poços foram necessários para o isolamento do vírus recombinante e avaliados em microscópio de luz invertido (Figura 43).

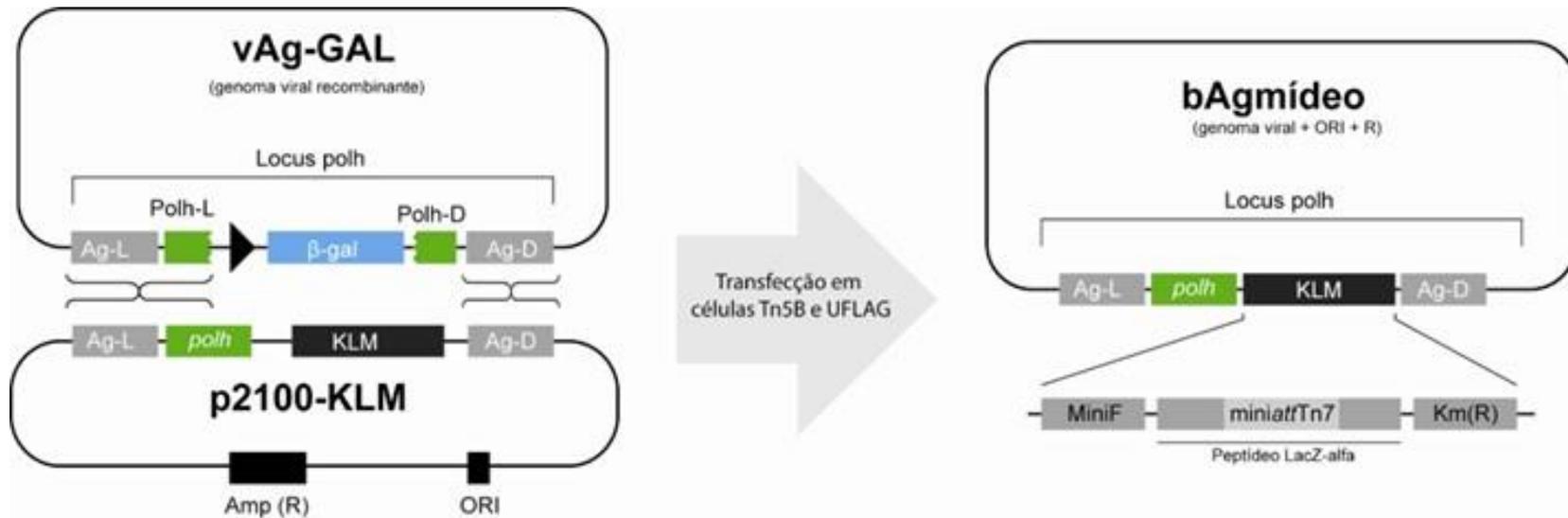


Figura 43: Diagrama representativo da recombinação homóloga em célula de inseto. Esquema representativo da recombinação homóloga em célula de inseto entre o genoma do vírus recombinante vAgGal (Ribeiro et al., 2001) e o plasmídeo p2100-KLM, construído nesse trabalho. O *Polh-L* e *Polh-D*, referem-se ao *locus* esquerdo e direito da poliedrina, que foram interrompidos com a inserção do *β-gal*, gene da *β-galactosidase*. O *Ag-L* e *Ag-D* correspondem as regiões para recombinação homóloga do flanco esquerdo e direito do gene da poliedrina de AgMNPV, respectivamente. *KLM*, o cassete *KLM* que possui o *MiniF*-replicon; *miniattTn7* (sítio único de transposição do TN7 L e TN7 R no bacmídeo) e o gene de resistência a canamicina *Km (R)*; *ORI* = origem de replicação em bactéria; *Amp (R)*, gene de resistência a Ampicilina. O “bAgmídeo” refere-se ao vAgKLM com locos de recombinação homóloga sítio específico (genoma de AgMNPV + cassete *KLM* inserido)

4.6.1.2 Confirmação do cassete KLM no genoma do vAgGal

Para confirmar a construção do baculovírus recombinante vAgMNPV-KLM foi preparada uma reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o cassete KLM, controle positivo o gene *parp* (gene específico do genoma do AgMNPV), como controle negativo o par de oligonucleotídeos CATHAcF/CATHAcR, construídos a partir das sequências nucleotídeos do gene *v-cath* (Lima et al., 2013), gene ausente no genoma do AgMNPV (Tabela 14). A reação de amplificação foi realizada com a enzima *Taq* DNA polimerase (PHT - Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda.) seguindo as recomendações do fabricante. Os programas usados para amplificação dos fragmentos estão descritos na Tabela 15. As reações de digestão foram com enzimas de restrição: *Pst* I/ *Bsu*36I e *Eco*RI, seguindo as recomendações do fabricante.

4.6.2 Estratégia de recombinação homóloga em *E. coli* cepa, BJ5183

A presente estratégia baseia-se na utilização de células competentes de *E. coli* da cepa BJ5183 (mutante para proteína RecA, Stratagene). Esta cepa possui como característica genotípica *endA1*, *sbcBC*, *recBC*, *galK*, *met thi-1*, *bioT*, *hsdR* (Strr), para maior eficiência de transformação e propagação estável de DNA.

Em resumo, a estratégia desenvolvida envolve um vetor de transporte linearizado, marca de seleção por antibiótico e regiões homólogas (por exemplo, p2100-KLM) e em conjunto com o genoma vAgGal superenrolado foram transformados (Figura 44). Após a obtenção dos clones o DNA recombinante pode ser simplesmente transformado em uma estirpe *E. coli* RecA, *end A* (como DH10B).

O plasmídeo p2100-KLM foi linearizado pela PCR com o par de oligonucleotídeos SphIF/ PstIR, com amplificação esperada e em seguida purificado com kit da Quiagen (QIAEX® II-Gel Extraction Kit). A transformação foi realizada pelo método eletroporação (Sambrook et al., 2001), com o p2100-KLM linearizado por PCR e o DNA genômico de vAgGalA2 purificados, na proporção 3:1, na concentração de 100 ng/μL do inserto e 500 ng/μL do DNA genômico. A recombinação foi realizada em células de *E. coli* BJ5183 eletrocompetentes. A seleção dos clones foi feita em meio LB-ágar seletivo (canamicina (Sigma-Aldrich®), X-gal 20 μg/mL (Promega®), IPTG 40 μg/mL (Sigma-Aldrich®) e todas as colônias azuladas foram isoladas para avaliação da presença do cassete KLM.

Os clones obtidos por recombinação homóloga em bactéria cepa BJ5183 foram confirmados pela PCR, da mesma forma como descrito no item 4.6.1.2. Finalmente, os clones confirmados foram selecionados por transfecção do DNA em células de insetos Tn-5BI- 4 e/ou UFL-AG-286. Os vírus recombinantes foram gerados tipicamente dentro de 7-10 dias, avaliados em microscópio de luz invertido. O DNA do BV (vírus extracelular) foi extraído e transformados em células de *E.coli* DH10B (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells-Invitrogen™), eletrocompetentes. Em seguida, o DNA das colônias azuladas crescidas em meio seletivo LB-Ágar foi confirmado por clivagem com enzimas de restrição: *Pst* I/ *Bsu*36i e *Eco*R I, seguindo o protocolo do fabricante.

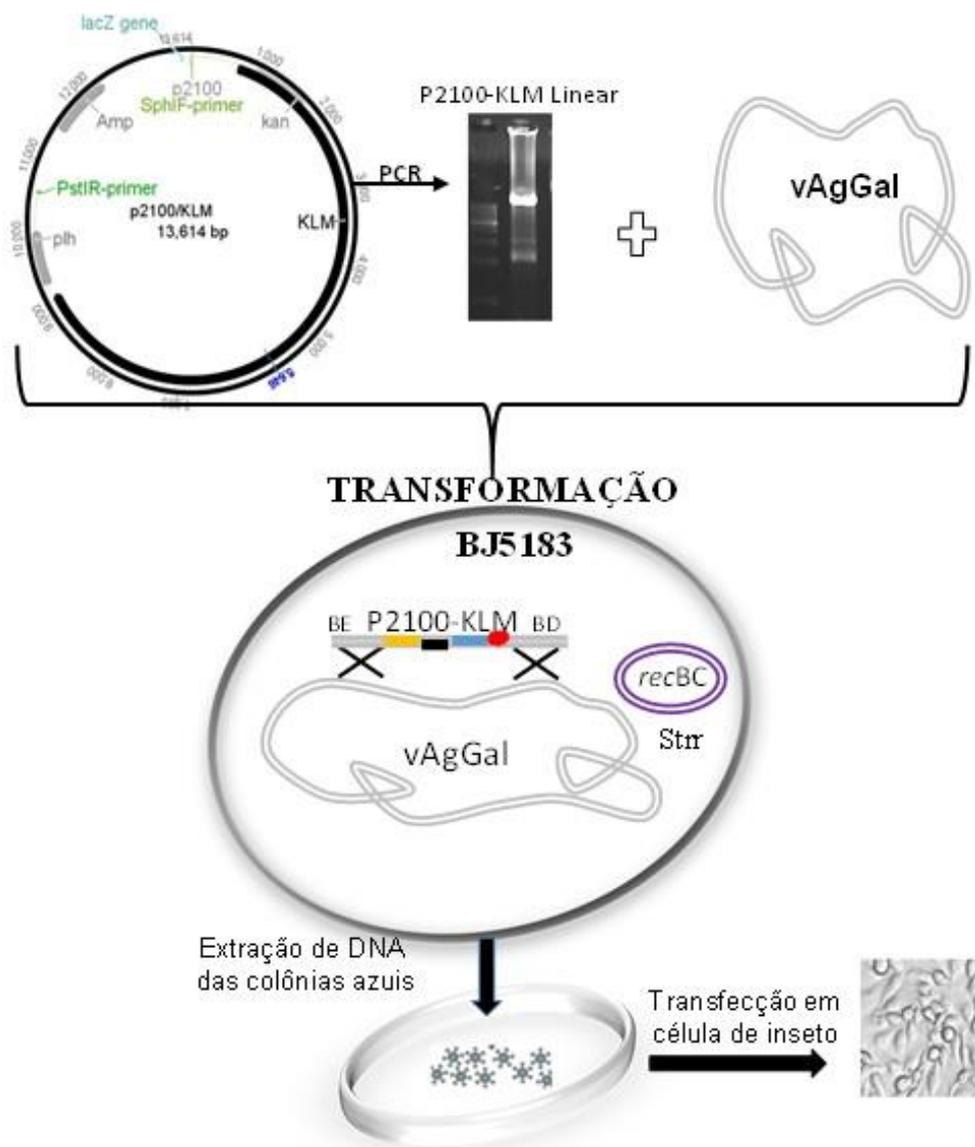


Figura 44: Diagrama esquemático de recombinação homóloga em sistema de células competentes de *E. coli* da cepa BJ5183. Vetor de transferência com gene de interesse (cassete KLM) clonado no plasmídeo p2100 (p2100-KLM). O plasmídeo foi linearizado por PCR (oligonucleotídeos PstI-F/SphI-R), com fragmento de 10.602 pb e em seguida cotransformado em células competentes de *E. coli* BJ5183 com genoma do baculovírus recombinante, vAgGal. BE " braço esquerdo " com 670 nt e BD " braço direito " com 576 nt representam as regiões mediadoras da recombinação homóloga entre o vetor de transporte, que correspondem o flanco esquerdo e direito do gene da poliedrina de AgMNPV e o genoma do vAgGal (ver item 3.3 para a composição e sequência). Os recombinantes foram selecionados por resistência à canamicina e pela coloração azulada das colônias. Então, a recombinação foi confirmada por análises da PCR. DNA do vírus recombinante foi transfectado em células de insetos Tn5B. Os vírus recombinantes foram gerados tipicamente dentro de 7-10 dias.

4.6.3 Estratégia de recombinante por ligação em sítio único no genoma AgMNPV

4.6.3.1 Sítio *Bsu36I*

A amplificação do cassete KLM foi a partir do p2100-KLM utilizando o par de oligonucleotídeos desenhados com sítio único de restrição, *Bsu36I* (Tabela 14).

O DNA genômico de AgMNPV e o cassete KLM purificado foram digeridos com *Bsu36I* por de 12 horas a 37° C. Para essa reação foi utilizado 100 ng de DNA plasmidial, 5 U da enzima *Bsu36I* (Promega®), tampão da enzima (Promega®) diluído 10 x e H₂O milliQ q.s.p. O cassete KLM foi desfosforilado com a enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (Promega), e purificado a partir do gel de agarose utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O DNA genômico de AgMNPV digerido foi precipitado com isopropanol. Visando à otimização da reação de ligação, diferentes concentrações do fragmento KLM e do DNA genômico de AgMNPV foram utilizadas. A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs), de acordo com as recomendações do fabricante. Após incubação, a reação foi utilizada na transformação em células eletrocompetentes de *E.coli* DH10B (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells-Invitrogen™). As bactérias foram semeadas em meio LB-ágar seletivo (canamicina (Sigma-Aldrich®), X-gal 20 µg/mL (Promega®), IPTG 40 µg/mL (Sigma-Aldrich®). Colônias azuladas foram isoladas para avaliação da presença do recombinante vAgMNPV-KLM. Os plasmídeos obtidos foram confirmados por clivagem com enzimas de restrição: *PstI*/*Bsu36I* e *EcoRI* para confirmação da construção do vírus recombinante vAgMNPV-KLM.

4.6.3.2 Sítio *FseI*

Como previamente descrito no item 4.6.3.1, foi também construído um recombinante vAgMNPV-KLM, por ligação no sítio único *FseI* do genoma de AgMNPV, com par de oligonucleotídeos desenhados com esse sítio (Tabela 14).

O DNA genômico de AgMNPV e o cassete KLM purificado foram digeridos com *FseI* por de 12 horas a 37° C. Para essa reação foi utilizado 100 ng de DNA plasmidial, 5 U da enzima *FseI* (New England BioLabs), tampão da enzima (New England BioLabs) diluído 10 x e H₂O milliQ q.s.p. O cassete KLM foi desfosforilado com a enzima Antarctic Phosphatase (New England BioLabs), e purificado a partir do gel de agarose utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O DNA genômico de AgMNPV digerido foi precipitado com isopropanol, visando à

otimização da reação de ligação. Diferentes concentrações do fragmento KLM e do DNA genômico de AgMNPV foram utilizadas. A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs), de acordo com as recomendações do fabricante. Após incubação, a reação foi utilizada na transformação em células eletrocompetentes de *E.coli* DH10B (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells-Invitrogen™). As bactérias foram semeadas em meio LB-ágar seletivo (canamicina (Sigma-Aldrich®), X-gal 20 µg/mL (Promega®), IPTG 40 µg/mL (Sigma-Aldrich®). Colônias azuladas foram isoladas para avaliação da presença do recombinante vAgMNPV-KLM. Os plasmídeos obtidos foram confirmados por clivagem com enzimas de restrição: *Pst*I/ *Fse* I e *Eco*RI para confirmação da construção do vírus recombinante vAgMNPV-KLM.

4.6.3.3 Avaliação da integridade genômica e replicativa de vAgMNPV-KLM

A integridade do genoma dos diferentes recombinantes vAgMNPV-KLM foi confirmada pelo perfil de enzimas de restrição e apenas aqueles que apresentaram o perfil esperado foram utilizados nas etapas posteriores. Para a avaliação da capacidade de formar partículas virais, os recombinantes foram transfectados em células UFL-AG-286 e/ou Tn5B com o uso de lipossomos (*FuGENE*® *Transfection Reagents-Promega*), de acordo com as recomendações do fabricante. A ocorrência de poliedros nas células transfectadas foram avaliadas em microscópio de luz invertido por um período de 7-10 dias.

4.7 Obtenção de linhagem de *E. Coli* DH10BAC contendo o bacmídeo de AgMNPV

Inicialmente, as células DH10Bac (Invitrogen) foram crescidas em meio de cultura na ausência do antibiótico canamicina e na presença de tetraciclina, visando a eliminação do bacmídeo do AcMNPV (resistência à canamicina). Células resistentes à tetraciclina e sensíveis à canamicina foram isoladas. A eliminação do bacmídeo do AcMNPV foi confirmada pela PCR com oligonucleotídeos específicos. A cepa foi então amplificada em meio LB e seu DNA plasmidial purificado. Posteriormente, o DNA plasmidial foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e um fragmento com cerca de 13.200 pb, correspondente ao tamanho do plasmídeo *helper* (Tabela 13) foi extraído do gel de agarose, purificado com o kit Quiagen (QIAEX® II-Gel Extraction Kit) e transformado em células de *E.coli* DH10B (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells-Invitrogen™) eletrocompetentes, para posteriormente ser introduzido o

vírus recombinante (vAgMNPV-KLM) com o fragmento de interesse (KLM).

5 Resultados e discussão

5.1 Amplificação do fragmento KLM e confirmação do plasmídeo p2100-KLM

Amplificação do cassete KLM, para clonagem no plasmídeo p2100, resultou claramente o tamanho de banda esperada de 8,6 kb (Figura 45).

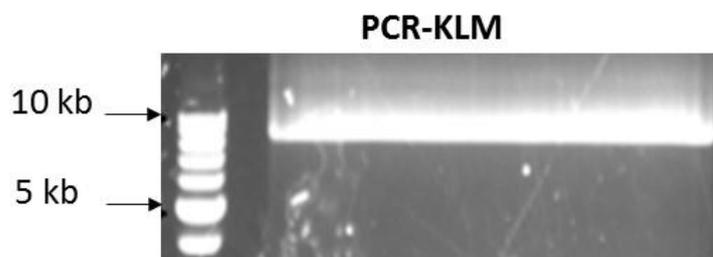


Figura 45: Amplificação do cassete KLM por PCR. Gel de agarose 0.8% mostrando a o fragmento correspondente ao cassete KLM (8,6 kb) amplificado por PCR. :

O p2100-KLM foi digerido com *Bsu36I* e resultou claramente no perfil esperado com duas bandas de cerca de 5,15 kb e 8,6 kb, que somados totalizam um fragmento de cerca de 13,6 kb. Correspondente ao vetor contruído (Figura 46).

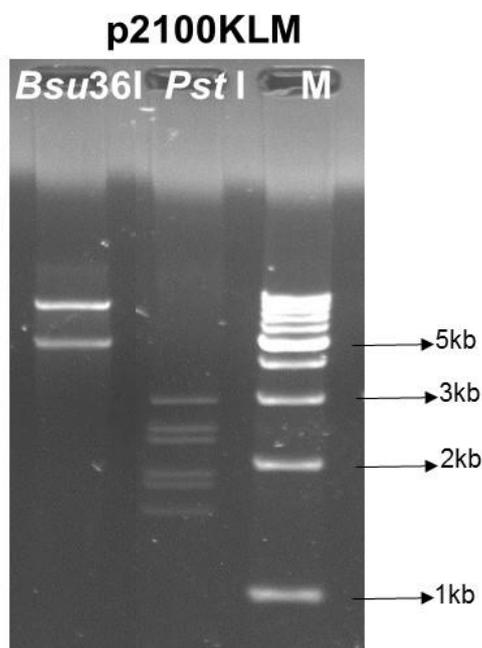


Figura 46: Gel de confirmação da construção do plasmídeo p2100-KLM. Perfil de restrição gerado pela digestão com *Bsu36I*, com dois fragmentos entre 5 e 9 kb e *Pst I* com clivagem em diferentes partes do plasmídeo, gerando fragmentos com cerca de 1 – 3 kb. Gel de agarose 0,8% resolvido por eletroforese.

5.2 Construção do vírus recombinante AgMNPV com o cassete KLM (vAgMNPV-KLM)

5.2.1 Estratégia de recombinação homóloga por co-transfecção em células de inseto

5.2.1.1 Co-transfecção em células de inseto

O resultado da co-transfecção do vetor p2100-KLM e o genoma do vírus recombinante vAgGal (*occ*⁻) em células de inseto gerou um possível vírus recombinante, pois esse resgatou em células de insetos o fenótipo de vírus oclusos (OB), com observação de poliedros no núcleo das células infectadas (Figura 47).

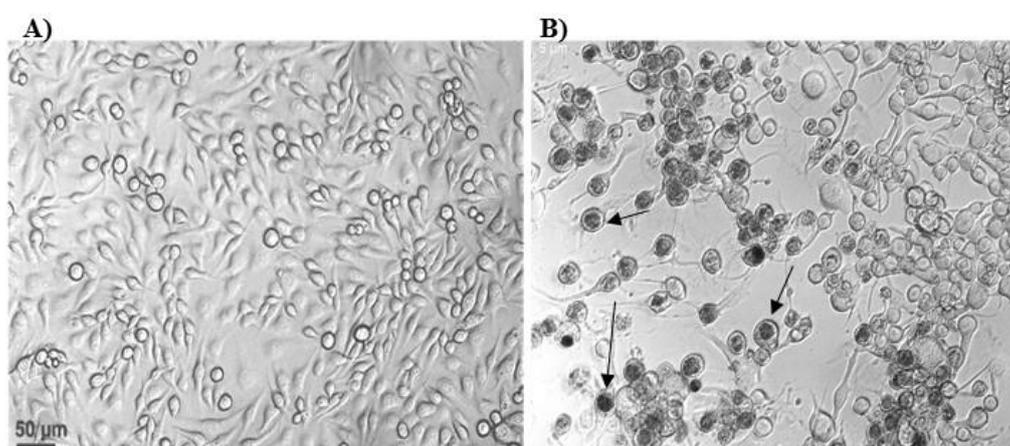


Figura 47: Resultado da co-transfecção em células de inseto com vetor p2100-KLM e o genoma do vírus recombinante vAgGal. A) Células de *T. ni* (Tn5B), sem infecção - Mock; B) Células Tn-5BI- 4 infectadas com o possível vírus recombinante com o fenótipo viral *occ*⁺, 7 d. p.i. As setas pretas indicam o núcleo da célula com poliedros (*occ*⁺).

5.2.1.2 Amplificação do DNA extraído do BV da co-transfecção

O DNA do BV do possível vírus recombinante foi usado como molde na reação da PCR. Resultou na amplificação somente dos fragmentos esperados. No gel “A”) o fragmento amplificado foi de cerca de 1 kb (gene da *parp*). No segundo gel “B”) o resultado da reação realizada como controle negativo foi a amplificação de um fragmento do DNA de AcMNPV de cerca de 1 kb (gene *v-cath* de AcMNPV). Pode-se observar que não houve amplificação com o DNA referente ao clone do provável recombinante de AgMNPV. No gel “C”) a confirmação do cassete KLM com amplificação de um fragmento de cerca de 300 pb (região do Mini-F) (Figura 48). Mediante a esses resultados foi realizada a próxima etapa, para confirmação do possível vírus recombinante com análise do perfil de restrição.

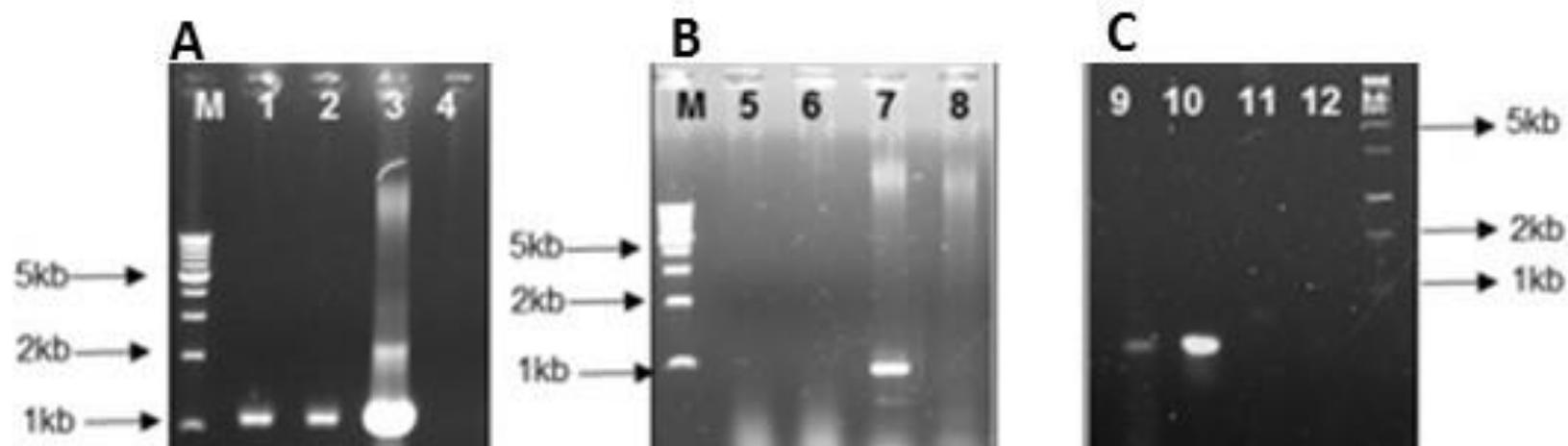


Figura 48: Confirmação do vírus recombinante vAgKLM por PCR. A) Amplificação do gene *parp* com os oligonucleotídeos PARPAgF e PARPAgR (1 kb) como controle positivo, (1) vAgKLM; (2) AgMNPV; (3) vAgGal; (4) branco da reação. B) Amplificação do *v-cath* com os oligonucleotídeos CATHAcF e CATHAcR (1 kb) como controle negativo, (5) vAgKLM; (6) AgMNPV; (7) bAcMNPV; (8) branco da reação; C) Amplificação de um fragmento do plasmídeo M13 com os oligonucleotídeos M13F/R (300 pb), para confirmação do cassete KLM, (9) vAgKLM; (10) bAcMNPV; (11) AgMNPV; (12) branco da reação. (M) 1 kb DNA Step Ladder (Promega).

O resultado da digestão com a enzima *EcoRI* do DNA de BV do possível vírus recombinante não foi o esperado. Quando comparado com a digestão *in silico* dos genomas do AgMNPV 2D e vAgMNPV-KLM (possível vírus recombinante) pode-se notar a diferença no tamanho e total de fragmentos gerados (Figura 49).

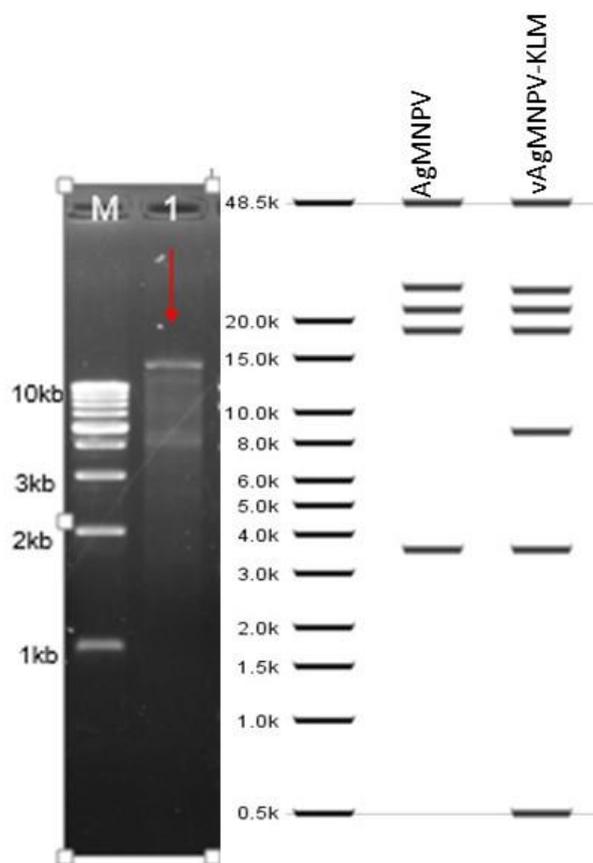


Figura 49: Perfil de restrição do possível vírus AgMNPV recombinante com *EcoRI*. À direita, perfil de restrição *in silico* do genoma de AgMNPV-2D e do vAgMNPV-KLM digerido *EcoRI*, gerando vários fragmentos acima de 10 kb e o menor 0,5 kb. Marcador de massa molecular do Software (Geneious version 6.1). A esquerda gel de agarose 1% com M (1 kb step ladder, Promega); 1 (DNA de BV digerido com *EcoRI* do possível vírus recombinante obtido por recombinação homóloga em células de insetos).

Esta estratégia fundamentou-se em outros estudos onde foi construído sistema de transposição sítio-específica pelo sistema Bac-to-Bac®. Wang e colaboradores (2003) construíram o bacmídeo de *Helicoverpa armigera* Single Nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) por recombinação homóloga em célula de insetos. Para essa construção foi usado o plasmídeo doador, que originalmente possui a sequência do promotor do gene da poliedrina do AcMNPV (*Ac-polh*), que foi substituída pela sequência do promotor da poliedrina de HaSNPV, sendo amplificado por PCR a partir do plasmídeo pCXW99

(Chen et al., 2000), originando o plasmídeo doador pHaFastBac1. O cassete de 8,5 kb (mini-F replicon, um gene de resistência à canamicina e os locais alvo TN7) foi digerido do plasmídeo BAC-Bsu36I (Pijlman et al., 2002) com enzima inserido no sítio *Bsu36I* do plasmídeo pHaFastBac1, dando origem ao vetor de transferência pHZB10. Esse plasmídeo de transferência foi co-transfectado com o DNA de HaSNPV selvagem em célula Hz2e5 para gerar o bacmídeo de HaSNPV.

Com base no sistema do Bac-to-Bac (Manual Bac-To-Bac Baculovirus; Luckow et al, 1993) a partir do plasmídeo p2100-KLM foi realizada tentativa para a construção do recombinante vAgMNPV-KLM e conseqüentemente, o vetor de expressão sítio-específica no genoma de AgMNPV. Mas, o perfil de restrição do recombinante obtido não foi o esperado. O resultado gerado foi menor em comparação ao genoma completo de AgMNPV (132,2 kb). Provavelmente, um vírus com genoma incompleto ou um contaminante.

5.2.2 Estratégia de recombinação homóloga em cepa BJ5183 com genoma de vAgGal

O plasmídeo p2100-KLM foi linearizado por PCR com os oligonucleotídeos SphIF/ PstIR. O resultado gerou claramente um fragmento do tamanho esperado de 10,6 kb (Figura 50).

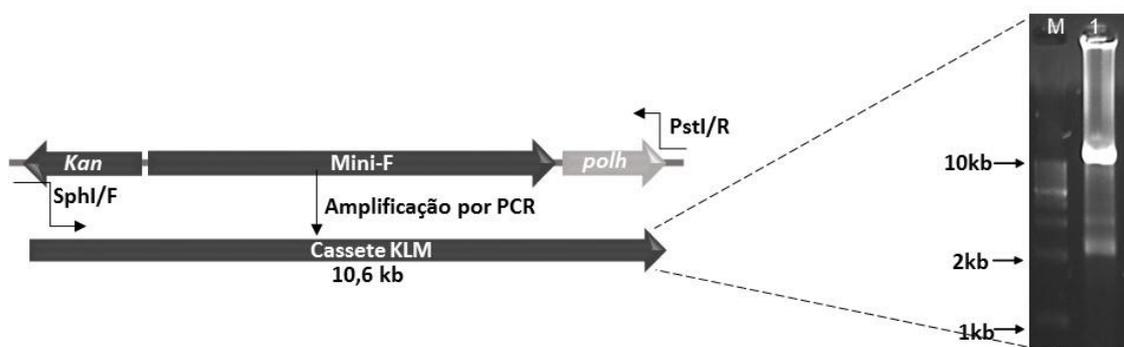


Figura 50: Linearização do plasmídeo P2100-KLM com os oligonucleotídeos SphI/F e PstI/. Linearização do plasmídeo P2100-KLM com os oligonucleotídeos SphI/F e PstI/R delimitando o tamanho do fragmento amplificado de 10,6 kb. O gene *polh* e marca de genende resistência kan (canamicina) são marcado na figura (Geneious version 6.1). Eletroforese em gel de agarose 0,8%: (M) Marcador de massa molecular 1kb DNA Step Ladder (Promega); (1) plasmídeo p2100KLM linear pela PCR com os oligonucleotídeos SphIF/ PstklmIR (10,6 kb).

Os resultados obtidos foram mais de 300 clones crescidos em meio seletivo. Foi realizada a extração do DNA plasmidial de 60 clones. A recombinação homóloga ocorreu pela transformação em células *E. coli*, cepa BJ5183, uma estratégia utilizada com sucesso

em vetores adenovirais (He et al., 1998; Wu et al., 2008).

Depois o DNA foi usado como molde na reação da PCR na detecção do cassete KLM e o gene da *parp* presente no genoma do baculovírus AgMNPV, respectivamente. Foram amplificados os tamanhos esperados, um fragmento correspondente ao cassete KLM com cerca de 2.9 kb e um fragmento com cerca de 1 kb correspondente ao gene da *parp* (dados não mostrados).

Os clones positivos na PCR foram transfectados em células de inseto e o resultado da transfecção foi observada após sete dias. As células foram avaliadas em microscópio de luz invertido e efeito citopatogênico foi observado com hipertrofia nuclear devido ao acúmulo de DNA viral, proteínas estruturais do vírus e cavidades ou lacunas dentro do núcleo onde os nucleocapsídeos, recém-formados, são acumulados (Young et al., 1993). Contudo, o vírus recombinante não foi confirmado pelo perfil de restrição. A mesma hipótese do item anterior (5.2.1) pode ser levantada, de vírus com genomas incompletos ou um contaminante.

5.2.3 Estratégia de recombinação por ligação em sítio único no genoma do AgMNPV

Os resultados obtidos foram mais de 300 clones para cada sítio de ligação específica. DNA de 60 clones obtidos da ligação no sítio *FseI* foram digeridos com a enzima *EcoRI* (DNA do clone *FseI* A9 e um *pool* do DNA dos demais clones *FseI*). O perfil de restrição gerado foi comparado com o perfil *in silico* para o do genoma de AgMNPV e o vAgMNPV-*FseI*. Como observado na Figura 51, o padrão entre a digestão do DNA do clone do possível vírus e os apresentados *in silico*s não foram os mesmos. Para a ligação sítio específica em *Bsu36I* foi obtido o mesmo resultado.

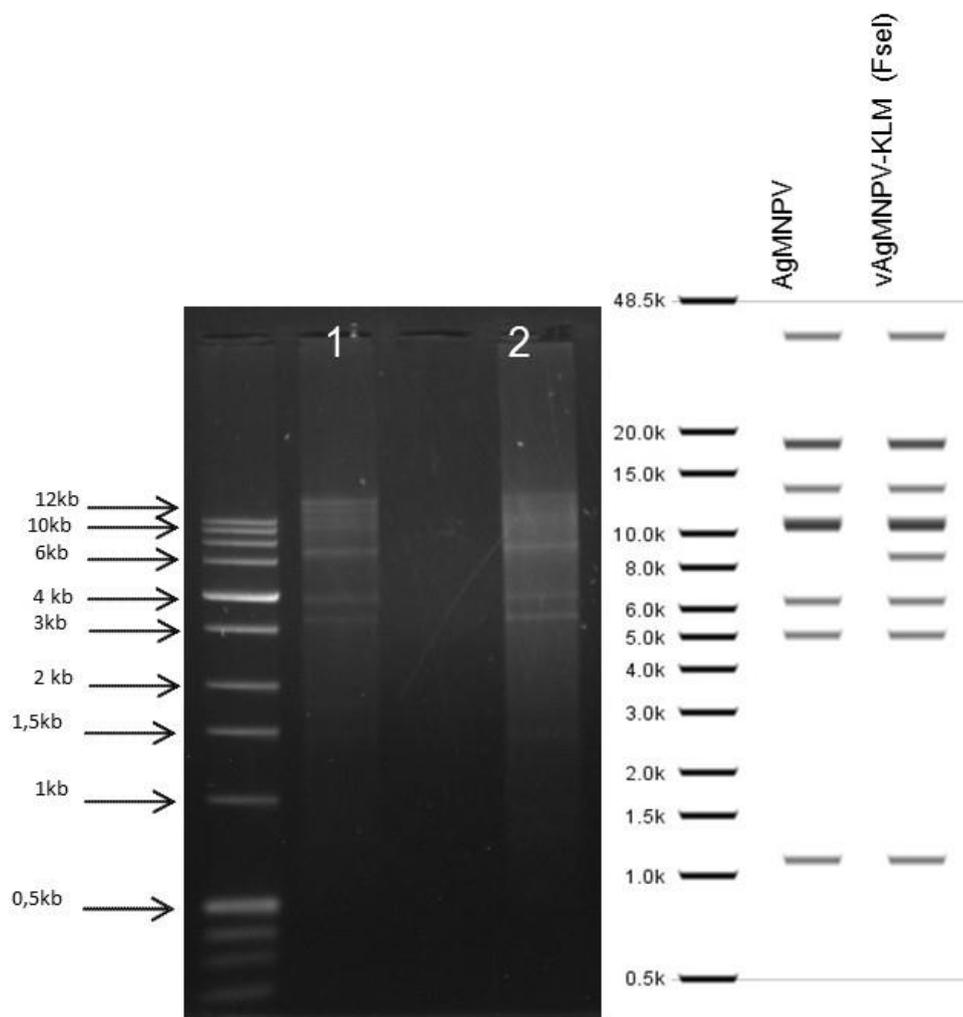


Figura 51: Perfil de restrição dos clones (vAgMNPV-FseI) obtido por ligação no sítio *FseI* digerido com *EcoRI*. À direita, perfil de restrição *in silico* do genoma de AgMNPV e o vAgMNPV-KLM (*FseI*) digeridos com enzima *EcoRI*, gerando vários fragmentos acima de 10 kb e o menor 0,5 kb. Marcador de massa molecular do Software (Geneious version 6.1). A esquerda gel de agarose 1% com M (1 kb DNA ladder, Promega); 1 (Clone *FseI* A9) e 2 (*pool* de clones obtidos por ligação do cassete KLM no sítio *FseI* do genoma de AgMNPV), digeridos com enzima *EcoRI*.

Vários estudos mostram que a recombinação homóloga usando genoma linear aumenta consideravelmente a chance de recombinação. Kitts e colaboradores (1990) relataram uma fração 10 vezes mais elevada de vírus recombinantes em cultura de células de insetos com DNA viral linear, do que os obtidos a partir de co-transfecções com DNA circular de AcMNPV.

Esta estratégia foi usada com sucesso no trabalho de construção do bacmídeo baseado no genoma de *Spodoptera exigua multicapsid nucleopoliedrovirus* (SeMNPV). O cassete KLM foi retirado plasmídeo BAC-*Bsu36I* (Pijlman et al., 2002) com o adaptador para o sítio de único *Bsu36I*. Inserido no *locus* do gene da poliedrina do genoma de

SeMNPV, gerando o bacmídeo SeBAC10. Uma vez que, o bacmídeo recombinante não possui o gene da proteína poliedrina, o gene foi reintroduzido por transposição sítio-específica, resultando no bacmídeo SeBAC10ph. A confirmação do bacmídeos foi realizada pela transfecção em células de inseto com produção de poliedro, resgatando o fenótipo (Yang, 2003). De forma similar, essa metodologia foi usada para gerar o bacmídeo de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), por ligação do cassete KLM no sítio único do genoma (Simón, et al., 2008).

Com base nestes autores foi realizada mais uma estratégia, a partir do genoma de AgMNPV 2D e o produto da PCR (KLM *FseI* e *Bsu36I*), por ligação em sítio único do genoma na tentativa da construção do vetor de expressão sítio-específica de AgMNPV. No entanto, a integridade do genoma do possível vírus recombinantes obtido também não pode ser confirmada por digestão, quando comparados com o perfil esperado. As mesmas hipóteses anteriores podem ser levantadas, de vírus com genomas incompletos ou um contaminante.

6 Conclusão

O sistema Bac-to-Bac[®] (Manual Bac-To-Bac Baculovirus) proporciona um método mais rápido e eficiente de geração de baculovírus recombinantes (Luckow et al., 1993), quando comparado com os métodos convencionais por recombinação homóloga. Portanto, esse trabalho teve como objetivo construir um baculovírus AgMNPV recombinante usando a metodologia do Bac-to-Bac[®]. Assim, foram utilizadas diferentes estratégias na tentativa de construção de um bacmídeo derivado do AgMNPV: A inserção do KLM no genoma de um baculovírus é um processo demorado e que requer extensivas manipulações do genoma viral (Meyer et al., 2010) sendo sua eficiência de 0,1 a 1% (Yao, et al., 2007).

A construção do vírus recombinante (vAgMNPV-KLM) no presente trabalho não obteve sucesso em nenhuma das estratégias utilizadas. Todos os recombinantes obtidos em *E. coli* não foram infectivos em células de inseto após transfecção do DNA. Além disso, os DNAs desses recombinantes eram muito menores do DNA viral selvagem, evidenciando a formação de genomas defectivos.

7 Perspectivas

Em relação ao capítulo I a análise do viroma de plantas de melancia, os seguintes trabalhos futuros deverão ser realizados:

- Amplificação por PCR das extremidades 3' e 5' da sequência de cDNA (RACE - Roche, Applied Science) para completa caracterização dos genomas dos vírus estudados;
- Confirmação epidemiológica dos vírus identificados através de experimentos em gama de plantas hospedeiras, com inóculo procedente das três áreas estudadas (nos municípios de Formoso do Araguaia, Porto Nacional e Lagoa da Confusão do estado do Tocantins);
- Investigar as demais sequências geradas pelo sequenciamento NGS, assim como, resultados obtidos de outros possíveis genomas virais, observadas durante a execução do presente trabalho.

Com relação ao capítulo II, o estudo para a construção do sistema BEV, pretende-se:

- Reavaliar e estudar as estratégias usadas, bem como, usar outras (Exemplo: recombinação em leveduras) para construção do vetor de expressão no genoma de AgMNPV.

Referências bibliográficas

- AHRENS, C.H.; LEISY, D.J.; ROHRMANN, G.F. Baculovirus. DNA Replication. In: Eukaryotic Cells. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 855-872, 1996.
- ARDISSON-ARAÚJO, D.M.; MELO, F.L.; CLEM, R.J.; WOLFF, J.L.; RIBEIRO, B.M. A Betabaculovirus-Encoded gp64 Homolog Codes for a Functional Envelope Fusion Protein. **Journal of Virology**, v. 90, p. 1668-1672, 2015.
- ARDISSON-ARAÚJO, D.M. P.; PEREIRA, B.T.; MELO, F.L.; RIBEIRO, B.M.; BÁO, S.N.; ZANOTTO, P.M.A.; MOSCARDI, F.; KITAJIMA, E.W.; SOSA-GOMEZ, D.R.; WOLFF, J.L.C. A betabaculovirus encoding a gp64 homolog. **BMC Genomics** (artigo aceito para publicação), 2016.
- BARRY, G.F. A Broad Host-Range Shuttle System for Gene Insertion in to the Chromosomes of Gram-negative Bacteria. **Gene**, v. 71, p. 75-84, 1988.
- BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURTAK, E. (Ed.) **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p. 1-72, 1991.
- BLISSARD, G.W. Baculovirus-insect cell interactions. **Cytotechnology**, v.20, p. 73-93, 1996.
- BLISSARD, G.W.; ROHRMANN, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 127-155, 1990.
- BUENO, A.deF.; PANIZZI, A.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; GAZZONI, D.L.; MOSCARDI, E.H.F.; CORSO, I.C.; OLIVEIRA, L.J.; ROGGIA, S. Histórico e evolução do Manejo Integrado de Pragas da soja no Brasil. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. **Soja - Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. EMBRAPA, Londrina- PR. p. 37-74, 2012.
- CAO, C; WU, X.; LU, X.; ZHAO, N.; YAO, H. Development of a rapid and efficient BmNPV baculovirus expression system for application in mulberry silkworm, *Bombyx mori*. **Current Science**, v. 91, p.1892-1697, 2006.
- CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L. Baculovirus: Agentes de Controle Biológico. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MONNERAT, R.G (Eds). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. p. 175-194, 2006.
- CHEN, X.; LI, M., SUN, X.; ARIF, B.M.; HU, Z.H.; VLAK, J.M. Genomic organization of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Archives Virology**, v.145, p. 2539-2555, 2000.
- CORDEIRO, B.A.; TIBURCIO, V.H.S.; HALLWASS, M.; PAES, H.C.; RIBEIRO, B.M. Structural and ultrastructural alterations of Malpighian tubules of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected with different *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) recombinant viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 7-19, 2008.

FEDERICI, B.A. Baculovirus Pathogenesis. In: MILLER, L.K. (Ed.). **The baculoviruses**. Plenum Press, New York, New York. p. 33–59, 1997.

FUNK, C. J., BRAUNAGEL, S. C., ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York, Plenum. p. 7-32, 1997.

GRANADOS, R.R; GUXUN, L; DERSKSEN, A.C.G; MCKENNA, K.A.A. New insect cell line from *trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1- 4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 260-266, 1994.

HE, T.C.; ZHOU, S.; da COSTA, L.T.; YU, J.; KINZLER, K.W; VOGELSTEIN, B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS**, v. 95, p. 2509–14, 1998.

HILTON, S.; KEMP, E.; KEANE, G.; WINSTANLEY, D. A bacmid approach to the genetic manipulation of granuloviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 152, p. 56-62, 2008.

HORTON, H.M.; BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cell and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, v. 67, p. 1860-1868, 1993.

HUNT, S.M.N.; THOMAS, M.R. Optimal Replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 809-819, 2005.

JEHLE, J.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.C.; CORY, J.S.; HERNIOU, E.A.; ROHRMANN, G.F.; THEILMANN, D.A.; THIEM, S.M.; VLAK, J.M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, p. 1257-1266, 2006.

KITTS, P.A.; AYRES, M.D.; POSSEE, R.D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. **Nucleic Acid Research**, v. 18, p. 5667-5672, 1990.

KOST, T.A.; CONDREAY, J.P.; JARVIS, D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 567-575, 2005.

LAUZON, M.A.H.; JAMIESON, B.P.; KRELL, J.P.; ARIF, M.B. Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 945–961, 2005.

LI, L.; DONLY, C.; LI, Q.; WILLIS, L.G.; KEDDIE, B.A., ERLANDSON, M.A.; THEILMANN, D.A. Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. **Virology**, v.297, p. 226- 244, 2002.

LI, L.; LI, Q.; WILLIS, L.G.; ERLANDSON, M.; THEILMANN, D.A.; DONLY, C. Complete comparative genomic analysis of two field isolates of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus-A. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 91-105, 2005.

LIMA, A. A.; ARAGÃO, C.W.S.; CASTRO, M.E.B.; OLIVEIRA, J.V.C.; GOMEZ, D. R.S.; RIBEIRO, B.M. A Recombinant AgMNPV Harboring *chia* and *v-cath* Genes from Defective NPV Induce Host Liquefaction and Increased Insecticidal Activity. **Plos One**, v. 8, p. e74592, 2013.

LU, A.; MILLER, L.K. Regulation of baculovirus late and very late expression. In: MILLER, L.K (Ed). **The baculoviruses**. New York, Plenum. p. 193–216, 1997.

LUCKOW, V.A.; LEE, S.C.; BARRY G.F.; OLINS, P. Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. **Journal of Virology**, v. 67, p. 4566- 4578, 1993.

MANUAL BAC-TO-BAC BACULOVIRUS Expression System An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. **Invitrogen Corporation**. Catalogo. 10359-016, 10360-014, 10584-027, 10712-024. (Version D). Disponível em: < www.invitrogen.com>.2015.

MAX, E.E.; MILLS, F.; CHU, C. Detection of isotype switch rearrangement in bulk culture by PCR. Chapter 10. In: COLIGAN, JOHN E (Ed). **Current Protocols in Immunology**. Unit 10.22. 2001. Disponível em: <<https://www.livivo.de/app/search/search?AU=%22Mills%2C+F%22&qid=1>>. Acesso em: 27/05/2014.

MEYER, M; ANGELIS, M.Hde.; WURST, W; KÜHN, R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS**, v.107, p. 15022–15026, 2010.

MIELE, S.A.; GARAVAGLIA, M.J.; BELAICH, M.N.; GHIRINGHELLI, P.D. Baculovirus: Molecular insights on their diversity and conservation. **International Journal of Evolutionary Biology**, v. 72, p. 3107–16, 2011.

MILLER, L.K. Introduction to the baculoviruses. In: _____. **The Baculoviruses**. p. 1-6. 1997.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L.; CASTRO, M.E.; MOSCARDI, M.L.; SZEWCZYK, B. Baculovirus pesticides: Present state and future perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Eds). **Microbes and Microbial Technology**, p. 415-445, 2011.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidóptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOSCARDI, F. Utilização de Baculovirus anticarsia no controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. **EMBRAPA-CNPSO, (Comunicado Técnico, 23)**, 21p. 1983.

MOTOHASHI, T.; SHIMOJIMA, T.; FUKAGAWA, T.; MAENAKA, K.; PARK, E.Y. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. **Biochem Biophys Research Commun**, v. 326, p. 564-569, 2005.

NAVA, D. E.; NACHTIGAL, G. F. Controle biológico no Sul do Brasil. **Revista de Controle Biológico**, v. 1, p. 15-18. abr., 2010.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V.A. **Baculovirus Expression Vectors**. A laboratory manual. New York, W. H. Freeman and Company. 347 p. 1992.

OLIVEIRA, J.V.C.; WOLFF, J.L.C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B.M.; CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J.E.; ZANOTTO, P.M.A. Genome of the most widely use viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3233–50, 2006.

ONO, C.; NAKATSUKASA, T.; NISHIJIMA, Y.; ASANO, S.; SAHARA, K.; BANDO, H. Construction of the BmNPV T3 bacmid system and its application to the functional analysis of BmNPVhe65". **Journal of Insect Biotechnology and Sericulture**, v. 76, p. 161-67, 2007.

PEARSON, M.N.; ROHRMANN, G.F. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families. **Journal of Virology**, v. 304, p. 81– 88, 2002.

PIJLMAN, G.P.; DORTMANS, J.C.; VERMEESCH, A.M.; YANG, K.; MARTENS, D.E.; GOLDBACH, R.W.; VLAK, J.M. Pivotal role of the non-hr origin of DNA replication in the genesis of defective interfering baculoviruses. **Journal of Virology**, v. 76, p. 5605-5611, 2002.

POMBO, V.; VELLOSO, L.M.; BERGMANN, M.R.; BÁO, S.N. Structural and ultrastructural changes during the infection of UFLAG-286 cells with the baculovirus AgMNPV. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 239-45, 1998.

POSSEE, R.D. Baculoviruses as expression vectors. **Current Opinion. Biotechnology**, v. 8, p. 569–572, 1997.

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia, Caracterização e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, B. S.(Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba – SP.; FEALQ. p. 481-503, 1998.

RIBEIRO B.M; GATI C.C; COSTA, M.H; MARUNIAK, J.E; POSSEE, R.D, MOSCARDI, F; ZANOTTO, P.M.A. Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harbouring the β -galactosidase gene. **Archives of Virology**, v. 146, p. 1355-367, 2001.

RIBEIRO, B.M.; MORGADO, F S; ARDISSON-ARAÚJO, D.M.P.; DA SILVA, L. A.; CRUZ, F.P; QUIRINO, M.S.; ANDRADE, M.deS.; CORRÊA, R.F.T. Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos In: RESENDE, R.R. **Biocologia Aplicada à Saúde** - Fundamentos e Aplicações. Blucher. p. 255-306, 2015.

ROHRMANN, G.F.; **Baculovirus Molecular Biology**. 2. ed. United States of the American, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information. 188 p. 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning. Chapter 1. In: _____. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview. p. 3-170. 2001.

SIEBURTH, P.J.; MARUNIAK, J.E. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) to 3 nuclear polyhedrosis viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 24, p. 195-198, 1988.

SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; ASENSIO, A.C.; ROS, S.; GAYA, A.; CABALLEROB, P.; POSSEEA, R.D. Sf29 gene of *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* is a viral factor that determines the number of virions in occlusion bodies. **Journal of Virology**, v. 82, p. 7897–7904, 2008.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J.F.J.; OLIVEIRA, H. N.de. Controle biológico de Insetos-Praga na Soja. In: LOURENÇÃO, A.L.F.; GRIGOLLI, J.F.J.; MELOTTO, A.M.; PITOL, C.; GITTI, D.deC.; ROSCOE, R. (Ed.). **Tecnologia e produção: Soja 2013/2014**. Maracaju, MS: Fundação MS. p. 178-193, 2014.

SLACK, J.; ARIF, B.M. The baculoviruses occlusion derived virus: virion structure and function. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 99-165, 2007.

SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D.; FRASER, M.J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology**, v. 45, p. 215-25, 1983.

THEILMANN, D.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O'REILLY, D.R.; ROHRMANN, G.F.; THIEM, S.; VLAK, J.M. Family *Baculoviridae*. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.). **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York, Elsevier Academic Press. p. 177-185, 2005.

vanOERS, M.M. Opportunistic and challenges for the baculovirus expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. S3-S15, 2011.

VOLKMAN, L.E.; SUMMERS, M.D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 30, p. 102-103, 1977.

VOLKMAN, L.E., GOLDSMITH, P.A. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica nuclear* polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. **Virology**, v. 143, p. 185-195, 1985.

WANG, H.; DENG, F.; PIJLMAN, G.P.; CHEN, X.; SUN, X.; VLAK, J.M.; HU, Z. Cloning of biologically active genomes from a *Helicoverpa armigera single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus* isolate by using a bacterial artificial chromosome. **Virus Research**, v.97, p. 57-63, 2003.

WU, C.; NERURKAR, V.R.; YANAGIHARA, R.; LU, Y. Effective modifications for improved homologous recombination and high-efficiency generation of recombinant adenovirus-based vectors. **Journal Virology Methods**, v.153, p. 120–128, 2008.

XIANG, X.; YANG, R.; YU, S.; CAO, C.; GUO, A.; CHEN, L.; WU, X.; CUI, W.; CENIS, J.L. Construction of a BmNPV polyhedrin-plus Bac-to-Bac baculovirus expression system for application in silkworm, *Bombyx mori*. **Applied Microbiol and Biotechnol**, v. 87, p.289-295, 2010.

YANG, K.; PANG, Y. Establishment of *Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus* BAC-TO-BAC expression system. (Article in Chinese-PMID: 15969056) **PubMed**. - indexed for **MEDLINE**, v. 19, p. 412-418, 2003.

YAO, L.G.; LIU, Z.C.; ZHANG, X.M.; KAN, Y.C.; ZHOU, J.J. A highly efficient method for the generation of a recombinant *Bombyx mori* nuclear-polyhedrosisvirus Bacmid and large-scale expression of foreign proteins in silkworm (*B. mori*) larvae. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 48, p. 45-53, 2007.

YORI, M.; NAKAYA, H.; INAGAKI, K.; PICHYANGKUL, S.; YAMAMOTO, D.S.; KAWASAKI, M.; KWAK, K.; MIZUKOSHI, M.; GOTO, Y.; MATSUOKA, H.; MATSUMOTO, M.; YOSHIDA, S. Protective Efficacy of Baculovirus Dual Expression System Vaccine Expressing *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein. **Plos One**, v. 8, p. e70819, 2013.

YOUNG, J.C.; MACKINNON, E.A.; FAULKNER, P. The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells in vitro infected by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Structural Biology**, v. 110, p. 141-153, 1993.

ZHANG, C.-X.; M.A, X.-C.; GUO, Z.-J. Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Virology**, v. 333, p. 190–199, 2005.

Anexo capítulo I

Número de acesso das sequências depositada no GenBank

Tabela A1: Lista de sequência nucleotídicas de isolados depositadas no GenBank e utilizadas na análise filogenética.

Nº Acesso GenBank: genoma complete de <i>Papaya ringspot virus</i>- PRSV									
EF017707	EU882728	KF791028	S46722	KJ75585	DQ340770	JX448371	AB369277	AY027810	KF734962
EU126128	AY162218	AY010722	X67673	JX448370	DQ340769	JX448373	X97251	HQ424465	EU475877
AY231130	EF183499	KC345609	DQ374152	JX448369	DQ340771	JX448372	DQ374153		
Nº Acesso GenBank: CP de <i>Papaya ringspot virus</i>- PRSV									
DQ104813	KC345599	JN132445	HQ328798	EF695399	KP019380	AF506888	FN822230	KJ755852	KF002679
DQ104820	KC345573	JN132456	DQ339579	DQ500100	EU475877	KF002693	FN822233	DQ340770J	AF506854
DQ104812	KC345584	JN132447	DQ339576	DQ500099	AY423557	KF002694	FN822231	X448370	AF506843
DQ104817	KC345588	JN132443	DQ339577	DQ500107	DQ088670	AF506868	FN822238	JX448369	AF506887
AF344649	GQ927328	JN132457	EF189732	KC345601	AY458619	AF506869	FN822237	JX448373	AF506865
AY094984	FR696592	PRU14737	EF189734	EF189735	EF210196	KF002707	FN822232	JX448372	FN808396
QJ755426	FR696590	PRU14738	EF189733	DQ339580	KC149500	KF002705	FN822240	DQ340769	AJ875101
AF344645	FR696593	PRU14740	DQ008449	DQ500095	JN979402	KF002708	FN822239	JX448371	AF506884
KC748221	FR696591	PRU14739	DQ008448	DQ500103	JQ394688	KF002709	AF506850	DQ340771	AF506885
AF344647	FR696596	JN132470	DQ008447	DQ500104	JN979401	KF002666	AF506849	AB369277	AF506872
AF344646	FR696595	JN132461	DQ008446	DQ500115	JN979399	FN808406	AF506844	AB044342	AF506871
AF344648	FR696594	JN132459	AF319497	KF289937	JQ394690	AJ875108	DQ868880	X78557	AF506874
AF530088	FR696589	JN132458	AF319502	KF289936	JQ394695	AF506880	DQ449536	KF002682	AF506873
AF530089	PAYW	JN132460	KC748229	KF289934	AY491011	AF506877	AF506841	KF002667	AF506886
AY094987	X67672	JN132465	KC748228	KF289939	AY458620	AF506875	AF506846	KF002684	AF506902
DQ374153	PAYP	JN132467	KC748227	KF289938	AY238883	AF506876	AF506842	KF002695	AJ875104
KC748211	S46722	JN132463	AY841757	KF289935	JQ394693	PRU14742	AF506848	KF002692	FN808398
KP161495	X67673	JN132468	KC748230	KF289933	AY458617	FN808410	AF506903	KF002686	FN808397
KP161497	EU126128	JN132466	DQ089482	DQ500111	JN979406	AJ875116	AF506858	KF002687	FN808413
KP161496	KC345609	JN132469	AF319492	DQ500110	DQ354072	AJ875110	KF033085	KF002688	AF506900
JN979405	JN132415	JN132455	AF319491	DQ500105	JQ394691	FN808409	KF033083	KF002681	AF506898
JN979403	JN132416	JN132464	AF319493	DQ500108	JN979400	AF506856	DQ449535	KF002685	AF506896
KP161498	JN132412	JN132462	KC748224	DQ500106	JQ394687	AF506862	AF506847	KF002669	AF506897
AY903266	JN132411	JN132471	KC748225	AY238881	JQ394689	AF506889	AF506852	X97251	DQ085856
KP161494	JN132408	PRU14736	KC748226	AY238882	JQ394694	AF506878	AF506857	KF033079	AY010720
AF506845	JN132418	S89893	AF319496	AF063220	JN979398	AF506881	FN822234	KF033088	AY010719
KC345572	JN132417	PRU14744	AF319503	KF989499	JX430436	AJ875103	AF506851	AY027811	AF506904
KC345570	JN132413	JN132424	AF319504	EF017707	FN808404	FN808411	FN822236	AY027812	AY010714
KC345571	JN132419	JN132426	AF319506	DQ650651	AJ875107	KF002699	FN822235	EU082207	AY010713
KC345594	JN132422	JN132425	AJ012649	KC748220	FN808405	KF002698	DQ449534	AF506866	DQ085864
KC345593	JN132423	JN132432	AY231130	AF319489	AJ875105	KF002703	KF033084	AF506867	AF506899
KC345595	JN132420	JN132429	AF319507	AF319490	AJ875113	KF002701	KF033082	AF506883	AB044340
KC345590	JN132421	JN132427	AF319505	AF319488	FN808402	KF002704	AF506861	AF506840	AY010716
KC345592	JN132410	JN132433	AJ012099	AY017189	AJ875114	KF002706	AF506860	JN559382	AY010715
KC345591	JN132449	JN132436	AF319498	AF319486	FN808401	KF002674	AF506859	EU882728	DQ085858
KC345589	JN132414	JN132437	AF319495	AF319485	FN808412	KF002675	AB583217	AB583210	AY010712
KC345587	JN132409	JN132438	AF319494	AF319501	FN822241	KF002676	AB583216	AF506879	AF374862
KC345585	JN132428	JN132430	AF196839	AY017190	FN808403	HQ424465	PAYCP	AY010722	DQ085857
KC345596	AF319499	JN132431	AF319484	AJ012650	AJ875106	KF002663	AB583219	AF506853	PRU14743
KC345597	JN132434	JN132435	AF319487	AF319500	FN808407	KF002661	AB583218	AF243496	AY010721
KC345598	JN132452	JN831644	AF319483	AF196838	AJ875115	KF002662	AB583220	X96538	AF506901
KC345600	JN132441	JN831646	AF309968	DQ354071	FN808408	KF734962	AB583224	KF002673	DQ085863
KC345579	JN132453	JN831643	AF319482	KC345602	AJ875111	KF002678	AB583225	KF002671	DQ085865
KC345578	JN132444	JN831645	KC345586	KC345603	AJ875102	KF002658	DQ449533	KF002689	AF374865
KC345577	JN132451	KF826912	DQ500102	KC345604	AJ875112	KF002660	AF506855	KF002672	AF374864
KC345580	JN132439	KF826911	DQ500101	HQ328794	FN808400	KF002665	DQ449532	KF002670	DQ085860
KC345574	JN132440	EF189736	DQ500093	HQ328795	KF002697	KF002664	AY010717	KF002683	DQ085862
KC345576	JN132442	DQ500112	DQ500094	HQ328796	KF002696	KF002659	AY010718	KF791028	DQ085859
KC345575	JN132446	DQ500113	DQ500096	DQ104823	AF506870	KF033095	AY162218	DQ419573	DQ088671
KC345581	JN132450	EF189730	DQ500097	DQ500117	AF506863	KF033094	AB044339	EF183499	DQ085861
KC345583	JN132448	DQ339578	DQ500114	DQ339581	AF506864	KF033093	AB044341	KF002677	AF506895
KC345582	JN132454	EF189731	DQ500098	DQ500116	AF506882	JQ318029	AY027810	KF002680	AF506894

1- Continuação Tabela 1A

Nº Acesso GenBank: CP de <i>Papaya ringspot virus</i> - PRSV									
AF506893	KM047884	EF104919	AY458618	AB583209	KF033089	AB583223	KC748206	KC748222	KC748217
DQ085866	KM047885	HM454196	AY238884	KP161501	KF033078	AB583222	KC748205	KC748214	KC748219
FN808399	AF469066	HM626465	KJ142142	KP161500	KF033081	AB583221	AF344650	Q755428	KC748218
AJ875109	AF469065	HM626464	AY238880	AF063221	KM279931	GU586789	KC662372	JQ755425	AF344644
FN808414	DQ077175	DQ666639	DQ192587	PRU14741	KP161499	AY094985	KC748204	KC748216	KC748213
AF506890	HM626467	DQ666641	DQ666640	KF033091	AB583203	AF344642	KC748209	DQ104815	KC748212
AF506891	HM778170	EF210197	KC149501	KF033092	AB583208	JQ755424	KC748210	DQ104816	AF344643
AF506892	HM454197	AY839865	JN979404	KF033080	AB583202	JQ755427	KC748208	DQ104819	AF344641
AY587583	HM754218	AF120270	DQ666638	KF033086	AB583205	KC768854	KC748207	DQ104822	DQ104818
AF374863	HM626466	AY839863	AY839864	KF033087	AB583214	AF344640	KC748215	DQ104821	DQ104814
KM047886	AY687386	KC149502	AY238885	KF033090	AB583212	AF344639	KC748223	DQ374152	
Nº Acesso GenBank: genoma complete de <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> - ZYMV									
AB188115	AJ316229	AY279000	JN192406	JN192412	JN192418	JN192424	KC665627	KC665633	KJ923768
AB188116	AJ515911	DQ124239	JN192407	JN192413	JN192419	JN192425	KC665628	KC665634	KJ923769
AB369279	AM422386	EF062582	JN192408	JN192414	JN192420	JN192426	KC665629	KC665635	NC_003224
AF014811	AY188994	EF062583	JN192409	JN192415	JN192421	JN192427	KC665630	KF976712	NC_003224
AF127929	AY278998	JN183062	JN192410	JN192416	JN192422	JN192428	KC665631	KF976713	ZYMP13PREP
AJ307036	AY278999	JN192405	JN192411	JN192417	JN192423	JQ716413	KC665632	KJ923767	ZYMPROPOLR
AJ316228									
Nº Acesso GenBank: CP de <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> - ZYMV									
AB004640	AJ459956	EF178505	HM005309	HQ543135	JF795793	JN315857	JX262132	KF056805	KM491910
AB004641	AJ515907	EU371645	HM005310	HQ543136	JF795794	JN315858	JX262133	KF836440	KM491911
AB063251	AJ515908	EU371646	HM005311	HQ543137	JF795795	JN315859	JX262134	KF976712	KM491912
AB127936	AJ515909	EU371647	HM005312	HQ543138	JF795796	JN315860	JX310103	KF976713	KM491913
AB188115	AJ515911	EU371648	HM072431	HQ543139	JF795797	JN315861	JX310104	KJ614229	KM491914
AB188116	AJ889243	EU371650	HM072432	JF308188	JF795798	JN315862	JX310105	KJ620410	KM491915
AB369279	AJ889244	EU561043	HM768168	JF308189	JF795799	JN315863	JX310106	KJ729041	KM491916
AB458595	AM422386	EU561044	HM768169	JF317296	JF795800	JN559383	JX310107	KJ729042	KM491917
AB458596	AX015294	EU561045	HM768170	JF317297	JF797206	JN561294	JX310108	KJ729043	KM491918
AF014811	AY074808	EU999757	HM768171	JF792361	JF797207	JN861004	JX310109	KJ729044	KM491919
AF062518	AY074809	EU999758	HM768172	JF792362	JF797208	JN861005	JX310110	KJ789916	KP742962
AF127929	AY074810	EU999759	HM768173	JF792363	JF797209	JN861006	JX310111	KJ789917	X62662
AF127930	AY188994	EU999760	HM768174	JF792364	JF797210	JN861007	JX310112	KJ789918	ZYMCP
AF127931	AY278998	FJ705252	HM768175	JF792365	JN183062	JN861008	JX310113	KJ789919	ZYMCPA
AF127932	AY278999	FJ705253	HM768176	JF792366	JN192405	JN861009	JX310114	KJ789920	ZYMPROPOLR
AF127933	AY279000	FJ705254	HM768177	JF792367	JN192406	JQ026020	JX310115	KJ866937	ZYMV
AF127934	AY597207	FJ705255	HM768178	JF792368	JF792407	JQ716413	JX310116	KJ866938	
AF435425	AY611021	FJ705256	HM768179	JF792369	JN192408	JQ899263	JX310117	KJ866939	
AF486822	AY611022	FJ705257	HM768180	JF792370	JN192409	JQ899264	JX310118	KJ866940	
AF486823	AY611023	FJ705258	HM768181	JF792371	JN192410	JQ899265	JX502667	KJ923767	
AF513550	AY611024	FJ705259	HM768182	JF792372	JN192411	JQ899266	JX502668	KJ923768	
AF513551	AY611025	FJ705260	HM768183	JF792373	JN192412	JQ899267	JX502669	KJ923769	
AF513552	AY611026	FJ705261	HM768184	JF792374	JN192413	JQ899268	JX502670	KM405795	
AJ251527	AY995216	FJ705262	HM768185	JF792375	JN192414	JX028592	JX502671	KM405796	
AJ307036	DD056806	FJ705263	HM768186	JF792441	JN192415	JX262117	JX502672	KM405797	
AJ316227	DI159774	FJ705264	HM768187	JF792442	JN192416	JX262118	JX502673	KM405798	
AJ316228	DI159814	FJ705265	HM768188	JF792443	JN192417	JX262119	JX502674	KM405799	
AJ316229	DJ418425	FJ705266	HM768189	JF792444	JN192418	JX262120	JX502675	KM405800	
AJ420012	DJ418432	FJ705267	HM768190	JF792445	JN192419	JX262121	JX502676	KM405801	
AJ420013	DQ124239	FJ705268	HM768191	JF792446	JN192420	JX262122	JX502677	KM405802	
AJ420014	DQ645729	FJ705269	HM768192	JF792447	JN192421	JX262123	KC665627	KM405803	
AJ420015	DQ925447	FJ705270	HM768193	JF792448	JN192422	JX262124	KC665628	KM491902	
AJ420016	DQ925448	FJ705271	HM768194	JF792449	JN192423	JX262125	KC665629	KM491903	
AJ420017	DQ925449	FJ705272	HM768195	JF792450	JN192424	JX262126	KC665630	KM491904	
AJ420018	DQ925450	GQ251520	HM768196	JF792451	JN192425	JX262127	KC665631	KM491905	
AJ420019	DQ925451	GQ482976	HM768197	JF792452	JN192426	JX262128	KC665632	KM491906	
AJ420020	EF062582	GU586790	HQ529776	JF792453	JN192427	JX262129	KC665633	KM491907	
AJ429071	EF062583	HM005307	HQ543133	JF795791	JN192428	JX262130	KC665634	KM491908	
AJ459954	EF122498	HM005308	HQ543134	JF795792	JN315856	JX262131	KC665635	KM491909	

