



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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE
VÍRUS DA FAMÍLIA *POTYVIRIDAE* INFECTANDO
LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS DA ESPÉCIE
*STYLOSANTHES GUIANENSIS***

Jamile Mendes de Souza

**Brasília-DF
2017**

Jamile Mendes de Souza

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE
VÍRUS DA FAMÍLIA *POTYVIRIDAE* INFECTANDO
LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS DA ESPÉCIE
*STYLOSANTHES GUIANENSIS***

Dissertação apresentada à Universidade de
Brasília como requisito parcial para obter-se
o título de Mestre em Fitopatologia pelo
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia.

Orientador:

Dr. Renato de Oliveira Resende

**Brasília-DF
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

De Souza, Jamile Mendes

Caracterização molecular e biológica de vírus da família *Potyviridae* infectando leguminosas forrageiras da espécie *Stylosanthes guianensis* / Jamile Mendes de Souza

Brasília, 2017. p. 72

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

I. *Potyviridae*- *Stylosanthes* spp.

II. Universidade de Brasília. PPG/FIT

III. Caracterização molecular e biológica de vírus da família *Potyviridae* infectando leguminosas forrageiras da espécie *Stylosanthes guianensis*.

*A todos os meus professores que me ajudaram a trilhar meus caminhos desde o ensino básico até hoje, **dedico.***

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha vida, oportunidade e por ter alcançado e finalizado mais uma etapa.

Ao meus pais Patrícia e Paulo e à minha irmã Louise, por todo carinho e apoio, incentivo e educação que foi dada, sempre me ensinando a importância de manter-me firme e perseverante em meus objetivos e princípios.

À Dr^a Anelise Franco Orílio pelo carinho, disponibilidade e todo conhecimento adquirido. Admiro a profissional que ela é e vejo nela um exemplo a ser seguido.

Ao Dr. Renato de Oliveira Resende por toda paciência, pelo exemplo de profissional e de pessoa, pelo carinho e por todo incentivo. Obrigada por tudo!

A todos os meus colegas do laboratório de Virologia Vegetal: Rayane Nunes, Athos Oliveira, Mariana Severo e principalmente à Karina Nascimento pelo companheirismo e parceria. Ao Dr. Fernando Lucas Melo e aos professores Tatsuya Nagata e Rita de Cássia pelo apoio.

Aos meus companheiros do curso de pós-graduação em Fitopatologia pelos momentos de aprendizado e alegrias: Marcelo Rennó, Moana Tavares, Cristiano Rodrigues, Anna Sofya, Luciane Reis e Érica Cristina. A caminhada não teria sido a mesma se fosse sem vocês.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília por todos os conhecimentos adquiridos.

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro. Aos membros da banca examinadora, Bergmann Moraes Ribeiro e Rosana Blawid.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Dr. Renato de Oliveira Resende, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Embrapa Gado de Corte, Embrapa Cerrados e Universidade de Brasília (UnB).

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE VÍRUS DA FAMÍLIA
Potyviridae INFECTANDO LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS DA ESPÉCIE
*Stylosanthes guianensis***

Jamile Mendes de Souza

DISSERTAÇÃO APROVADA em 22/02/2017 por:



Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília



Dr^a Rosana Blawid
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília



Dr. Renato de Oliveira Resende
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília (Orientador-Presidente)

Brasília-DF

2017

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
RESUMO GERAL	5
GENERAL ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO GERAL	9
OBJETIVO GERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1. O gênero <i>Stylosanthes</i>	12
1.1.1. Taxonomia do gênero <i>Stylosanthes</i>	12
1.1.2. Principais espécies e cultivares de <i>Stylosanthes</i>	13
1.1.3. Consórcio de <i>Stylosanthes</i> com gramíneas forrageiras	14
1.2. Vírus que infectam <i>Stylosanthes</i>	15
1.3. Família <i>Potyviridae</i>	16
1.4. Sequenciamento de alto desempenho (<i>Next Generation Sequencing-NGS</i>)	21
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE VÍRUS DA FAMÍLIA <i>POTYVIRIDAE</i> INFECTANDO LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS DA ESPÉCIE <i>STYLOSANTHES GUIANENSIS</i>	25
2.1. INTRODUÇÃO	26
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.2.1. Obtenção de amostras de <i>Stylosanthes</i> infectadas por novos membros da família <i>Potyviridae</i>	27
2.2.2. Purificação parcial de partículas virais	27
2.2.3. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática	28
2.2.4. Detecção das regiões 3' UTR, capa proteica (CP) e inclusões nucleares (Nib) de membros da família <i>Potyviridae</i> por RT-PCR nas plantas utilizadas	

no sequenciamento de alto desempenho	28
2.2.5. Clonagem das regiões 3' UTR, capa protéica (CP) e inclusões nucleares (NIb) de membros da família <i>Potyviridae</i> por RT-PCR nas plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho	30
2.2.6. Isolamento da região 5' UTR do genoma de novos membros da família <i>Potyviridae</i> através do método RACE (<i>Rapid Amplification cDNAs End</i>)	31
2.2.7. Análises filogenéticas das sequências de nucleotídeos e aminoácidos de membros da família <i>Potyviridae</i>	33
2.2.8. Detecção dos novos membros da família <i>Potyviridae</i> em vetores potenciais por RT-PCR	35
2.2.9. Caracterização da gama de hospedeiras	36
2.3. RESULTADOS	38
2.3.1. Purificação viral e extração de RNA total de amostras de <i>Stylosanthes guianensis</i>	38
2.3.2. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática	38
2.3.3. Detecção de <i>Stylosanthes mosaic associated virus 1</i> , <i>Stylosanthes mosaic associated virus 2</i> e <i>Stylosanthes mosaic associated virus 3</i> a partir das regiões 3' UTR, CP e NIb	39
2.3.4. Clonagem dos fragmentos referentes às regiões 3' UTR, CP e NIb dos vírus <i>StyMaV 2</i> e <i>StyMaV 3</i> amplificados por RT-PCR	40
2.3.5. Isolamento e sequenciamento da região 5' UTR dos genomas dos vírus de estilosantes via a técnica de 5' RACE (<i>Rapid Amplification cDNAs End</i>) ..	41
2.3.6. Análise filogenética utilizando sequências completas de nucleotídeos e aminoácidos da poliproteína de <i>StyMaV 1</i> , <i>StyMaV 2</i> e <i>StyMaV 3</i>	42
2.3.7. Análises comparativas de identidade genética utilizando sequências de nucleotídeos e aminoácidos das proteínas funcionais dos vírus <i>Stylosanthes mosaic associated virus 1</i> , <i>Stylosanthes mosaic associated virus 2</i> e <i>Stylosanthes mosaic associated virus 3</i> com as espécies tipo dos gêneros da família <i>Potyviridae</i>	43
2.3.8. Detecção em vetor potencial dos novos vírus encontrados em	

<i>Stylosanthes guianensis</i>	53
2.3.9. Caracterização da gama de hospedeiras	54
2.4. DISCUSSÃO	56
2.4.1. Caracterização molecular de <i>Stylosanthes mosaic associated virus 1</i> , <i>Stylosanthes mosaic associated virus 2</i> e <i>Stylosanthes mosaic associated</i> <i>virus 3</i>	56
2.4.2. Diversidade de novos membros da família <i>Potyviridae</i> infectando <i>Stylosanthes guianensis</i> , círculo de hospedeiros e potencial vetor	60
2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	62
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Principais relatos com vírus da família <i>Potyviridae</i> associados à espécies do gênero <i>Stylosanthes</i>	15
Tabela 1.2. Principais métodos atuais de tecnologias de sequenciamento de DNA	23
Tabela 1.3. Aplicações gerais dos principais métodos atuais de tecnologias de sequenciamento de DNA	23
Tabela 2.1. Dados das amostras biológicas de <i>Stylosanthes guianensis</i> utilizadas no sequenciamento de alto desempenho	28
Tabela 2.2. Condições usadas na PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) utilizadas para a detecção dos novos membros da família <i>Potyviridae</i> encontrados em <i>Stylosanthes guianensis</i>	29
Tabela 2.3. Condições usadas na PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) utilizadas para a detecção dos novos membros da família <i>Potyviridae</i> encontrados em <i>Stylosanthes guianensis</i>	33
Tabela 2.4. Sequências das espécies tipo de cada um dos gêneros da família <i>Potyviridae</i>	34
Tabela 2.5. Sequências das espécies selecionadas que pertencem à família <i>Potyviridae</i>	34
Tabela 2.6. Plantas usadas na determinação da gama de hospedeiras	36
Tabela 2.7. Sítios de clivagem dos três novos vírus da família <i>Potyviridae</i> encontrados em estilosantes	44
Tabela 2.8. Porcentagem de identidade de nucleotídeos (nt) de <i>Stylosanthes mosaic associated virus 1</i>	46
Tabela 2.9. Porcentagem de identidade de aminoácidos (aa) de <i>Stylosanthes mosaic associated virus 1</i>	47
Tabela 2.10. Porcentagem de identidade de nucleotídeos (nt) de <i>Stylosanthes mosaic associated virus 2</i>	48
Tabela 2.11. Porcentagem de identidade de aminoácidos (aa) de <i>Stylosanthes mosaic associated virus 2</i>	49
Tabela 2.12. Porcentagem de identidade de nucleotídeos (nt) de <i>Stylosanthes</i>	

mosaic associated virus 3	50
Tabela 2.13. Porcentagem de identidade de aminoácidos (aa) de Stylosanthes	
mosaic associated virus 3	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Stylosanthes</i> spp. em campo experimental	12
Figura 1.2. Estilosantes multilinha Campo Grande (<i>Stylosanthes capitata</i> e <i>Stylosanthes macrocephala</i>)	13
Figura 1.3. Consórcio de <i>Brachiaria brizantha</i> cv Xaraés e <i>Stylosanthes guianensis</i> cv. Mineirão	15
Figura 1.4. Esquema da partícula viral de membros da família <i>Potyviridae</i>	16
Figura 1.5. Organização genômica de gêneros monopartidos da família <i>Potyviridae</i> ..	17
Figura 1.6. Representação do genoma de <i>Blackberry virus Y</i>	17
Figura 1.7. Organização genômica de membros do gênero <i>Ipomovirus</i>	18
Figura 1.8. Organização genômica de uma espécie do gênero <i>Macluravirus</i>	18
Figura 1.9. Organização genômica do gênero <i>Potyvirus</i>	19
Figura 1.10. Organização genômica da espécie tipo do gênero <i>Bymovirus</i>	20
Figura 2.1. Sintomas virais em amostras de <i>Stylosanthes guianensis</i> cv. Mineirão ...	27
Figura 2.2. Esquema representativo do vetor plasmidial pGEM-T Easy Vector (Promega)	31
Figura 2.3. Experimento da gama de hospedeiras alternativas e potenciais de espécies virais encontradas em <i>Stylosanthes</i>	36
Figura 2.4. Extração de RNA total de amostras de <i>Stylosanthes guianensis</i>	38
Figura 2.5. Representação esquemática da organização genômica dos vírus encontrados em <i>Stylosanthes guianensis</i>	39
Figura 2.6. Detecção dos novos membros da família <i>Potyviridae</i> nas duas amostras de <i>Stylosanthes guianensis</i> (GC5559 e GC4364)	39
Figura 2.7. Clonagem de fragmentos genômicos de <i>Stylosanthes mosaic associated virus 1</i> e <i>Stylosanthes mosaic associated virus 2</i>	40
Figura 2.8. Fragmentos amplificados da região 5' UTR via técnica de 5' RACE-PCR de StyMaV 1 (A) e StyMaV 3 (B)	41
Figura 2.9. Árvore filogenética utilizando a sequência de nucleotídeo da poliproteína das espécies tipo de cada um dos gêneros dentro da família <i>Potyviridae</i> e os novos vírus de <i>Stylosanthes guianensis</i>	42

Figura 2.10. Árvore filogenética utilizando a sequência de aminoácido da poliproteína das espécies tipo de cada um dos gêneros dentro da família <i>Potyviridae</i> e os novos vírus de <i>Stylosanthes guianensis</i>	43
Figura 2.11. Mapa genômico dos novos vírus encontrados nas amostras de <i>Stylosanthes guianensis</i>	44
Figura 2.12. Matriz de comparação das sequências de nucleotídeo das proteínas das espécies tipo de cada um dos gêneros dentro da família <i>Potyviridae</i> e os novos vírus de <i>Stylosanthes guianensis</i>	52
Figura 2.13. Matriz de comparação das sequências de nucleotídeo das proteínas das espécies tipo de cada um dos gêneros dentro da família <i>Potyviridae</i> e os novos vírus de <i>Stylosanthes guianensis</i>	53
Figura 2.14. Plantas sintomáticas	54
Figura 2.15. Detecção por RT-PCR de duas novas espécies da família <i>Potyviridae</i> em <i>Nicotiana benthamiana</i> (A) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (B)	55

RESUMO GERAL

De SOUZA, Jamile Mendes. **Caracterização Molecular e Biológica de vírus da família *Potyviridae* infectando leguminosas forrageiras de *Stylosanthes guianensis*** 2017. 72p.

Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

As pastagens, no sistema produtivo brasileiro, ocupam uma grande e significativa área, com mais de 190 milhões de hectares de pastagens tropicais tanto naturais quanto plantadas e que servem como fonte de alimento para o rebanho brasileiro que possui cerca de 214 milhões de cabeças, sendo esse, o segundo maior rebanho comercial do mundo. Estas pastagens são em grande parte compostas por gramíneas e leguminosas forrageiras e são essenciais para a produção e qualidade da carne e leite bovinos. O uso de *Stylosanthes* (leguminosa) vem crescendo no Brasil devido seu valor nutricional, além disso, apresenta grande potencial em recuperação de pastagens e áreas degradadas devido à fixação de nitrogênio, tornando-a capaz de crescer em regiões muito arenosas, sendo muito resistente à seca. Porém, problemas como manejo inadequado, ausências de adubações periódicas e problemas bióticos, têm prejudicado áreas que são destinadas à pecuária. Além desses problemas, recentemente, tem-se observado em campos experimentais e naturais da Embrapa, sintomas típicos daqueles causados por agentes de etiologia viral. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar a diversidade e caracterizar molecularmente e biologicamente os vírus que estão infectando leguminosas forrageiras da espécie *Stylosanthes guianensis* no Brasil. Resultados preliminares obtidos via sequenciamento de nova geração (NGS) em duas amostras sintomáticas de *Stylosanthes guianensis*, oriundas da Embrapa Gado de Corte, detectou a presença de três novos vírus pertencentes à família *Potyviridae*. Simultaneamente, foi feita a montagem dos *contigs* e então, desenvolvidas ferramentas de detecção por RT-PCR com *primers* específicos em que uma região genômica, correspondente a 3' UTR, CP e NIB, foi amplificada e sequenciada pelo método Sanger. A partir do consenso do NGS, foram realizadas análises filogenéticas comparativas de nucleotídeos e também de aminoácidos das proteínas virais com base na poliproteína. Essas análises demonstraram que estes vírus potencialmente representam dois novos gêneros dentro da família e foram tentativamente nomeados como *Stylosanthes mosaic associated virus 1* (StyMaV 1), *Stylosanthes mosaic associated virus 2* (StyMaV 2) e *Stylosanthes mosaic associated virus 3* (StyMaV 3). As próximas etapas do estudo desses patógenos envolverão a produção de clones infecciosos que

permitirão uma melhor compreensão da interação entre esses novos membros da família *Potyviridae* e suas hospedeiras, assim como, possibilitar a busca de resistência genética em plantas forrageiras.

Palavras Chave: *Potyviridae*, leguminosas, pecuária, *Stylosanthes*,

Orientador - Dr. Renato de Oliveira Resende - UnB

GENERAL ABSTRACT

De SOUZA, Jamile Mendes. **Molecular and biological characterization of Potyviruses infecting forage legumes of the the species *Stylosanthes guianensis***. 2017. 72p. Dissertation (Master's degree in Phytopathology) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

In Brazil forage crops occupie a large and significant area, with more than 190 million hectares of tropical pastures both natural and planted and serving as a food source for the Brazilian cow herds that has about 214 million animals, this is the second largest commercial herd in the world. These pastures are largely composed of grasses and forage legumes and are essential for the production and quality of bovine meat and milk. The use of *Stylosanthes* (legume) has been increasing in Brazil its nutritional value, in addition, it presents great potential in the recovery of pastures and degraded areas due to the nitrogen fixation, being able to grow in very sandy regions, being very resistant, management problems, absences from accidents and biological problems, have impaired areas that are destined to livestock. Besides the problems, recently, it has observed in experimental and natural fields of Embrapa, typical symptoms caused by agents of viral etiology. In view of the above, the present work had as general objective to study the diversity and to characterize molecularly and biologically the viruses that are infecting forage legumes of the species *Stylosanthes guianensis* in Brazil. Preliminary results obtained through new generation sequencing (NGS) in two symptomatic samples of *Stylosanthes guianensis*, from the Embrapa Gado de Corte, detected a new presence of new genes in the *Potyviridae* family. At the same time, the contacts were assembled and RT-PCR detection tools with specific primers were developed in a genomic region, corresponding to 3'UTR, CP and NIB, amplified and sequenced by the Sanger method. From the consensus of the NGS, comparative phylogenetic analyzes of nucleotides and also of amino acids of the viral proteins based on the polyprotein were made. (StyMaV 1), *Stylosanthes* mosaic associated virus 2 (StyMaV 2) and *Stylosanthes* mosaic associated virus 3 (StyMaV 3). The pathogen study stages involve the production of infectious clones that allow a better understanding of the interaction between the new members of the *Potyviridae* family and their hosts, as well as, make possible a search of genetic resistance in forage plants.

Key words: *Potyviridae*, legumes, livestock, *Stylosanthes*,

Advisor - Dr. Renato de Oliveira Resende - UnB

INTRODUÇÃO GERAL

Dentro do cenário mundial, o Brasil ocupa a segunda posição como o país com a maior exportação, abate bovino, produção e consumo de carne (Usda, 2016). A produção é em grande parte através das pastagens de gramíneas e leguminosas forrageiras e a colheita é através do próprio pastejo, reduzindo os custos de produção e gerando um produto final mais saudável e com maior qualidade nutricional, ao contrário da produção baseada em sistema de confinamento adotado por alguns países (Daley *et al.*, 2010).

Nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste ocorreu uma diminuição das áreas de pastagens, devido a expansão das áreas agrícolas para o cultivo de monoculturas como milho, sorgo, feijão e soja (Barbosa *et al.*, 2015). Já nas regiões Norte e Nordeste, houve um aumento devido à adoção de novas técnicas de manejo do solo, das pastagens, uso de novos cultivares e plantas mais adaptadas ao tipo de clima dessas regiões e que são resistentes a pragas e doenças (Jank *et al.*, 2005).

Um dos principais problemas da degradação de áreas destinadas à pecuária é a ausência de adubações periódicas, falha no estabelecimento da pastagem, ataque de insetos praga e incidência de doenças causadas por diferentes agentes etiológicos (Dias-Filho, 2011). Segundo dados da FAO (2008), a má gestão da terra é outra grande causa da degradação dessas áreas, aproximadamente 22% das terras em processo de degradação estão em zonas ou muito áridas ou sub-áridas secas e 78% encontram-se em regiões mais úmidas.

O ataque de pragas e doenças é um problema que atinge as pastagens e limita seu potencial produtivo. Com a intensificação no cultivo das pastagens, houve o aumento de doenças prejudicando não só a produtividade como a qualidade das pastagens e levando até a morte das plantas. Nem sempre os patógenos responsáveis por algumas doenças são identificados e o conhecimento a respeito desses agentes etiológicos que prejudicam a produtividade das pastagens é algo pouco explorado. Dessa forma, as medidas de controle e manejo dessas doenças, torna-se algo difícil de ser aplicado (Verzignassi & Fernandes, 2001).

Existem muitas doenças importantes para os sistemas de produção de pastagens. Tais patógenos que causam problemas em plantas forrageiras são fungos que pertencem aos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*, associados ou não à fitonematoides do gênero *Pratylenchus*. No caso específico de estilósantes, a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) é a doença que mais afeta essa leguminosa, prejudicando seu crescimento, a produção de sementes e sua persistência no campo (Marchi *et al.*, 2011).

Quanto às doenças de etiologia viral, ainda são escassas as informações em leguminosas forrageiras. Diante disso, nota-se a necessidade de estudos biológicos e de

caracterização com o intuito de realizar um levantamento desses patógenos em áreas de pastagens e dessa forma propor medidas de manejo e controle. Há relatos nos últimos anos de plantas forrageiras em campo apresentando sintomas de mosaico, amarelecimento e nanismo, que são típicos de infecções virais (Verzignassi & Fernandes, 2001). Logo, diante da problemática, estudos aprofundados serão necessários para obter-se a caracterização desses patógenos e o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle.

OBJETIVO GERAL

Com base nos sintomas típicos de infecções virais tais como: mosaico, deformação foliar e pontos cloróticos observados em campos naturais, cultivados e experimentais de leguminosas forrageiras, o seguinte trabalho visou caracterizar molecularmente e biologicamente espécies virais encontradas em leguminosas forrageiras das espécies *Stylosanthes guianensis* como, avaliar o risco potencial para outras leguminosas amplamente cultivadas no Brasil como o feijão e a soja.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar os resultados preliminares obtidos via *Next Generation Sequence* - NGS mediante o sequenciamento por Sanger dos vírus encontrados em amostras de *Stylosanthes*.
- Desenvolver ferramenta de detecção de vírus infectando *Stylosanthes guianensis* através da técnica de RT-PCR
- Obter o genoma completo de três novos vírus de *Stylosanthes guianensis* por sequenciamento via Sanger.
- Identificar os vírus de *Stylosanthes guianensis* em vetores potenciais por RT-PCR.
- Caracterizar a gama de hospedeiros dos principais vírus identificados em *Stylosanthes guianensis*.
- Analisar os danos potenciais desses vírus em feijão e soja.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1. O gênero *Stylosanthes*

1.1.1. Taxonomia de *Stylosanthes* spp.

Stylosanthes é um gênero que pertence à família Fabaceae. Originário da América Latina, o gênero foi descrito por Swartz em 1788 apresentando apenas duas espécies. É uma leguminosa que ocorre em todos os estados brasileiros e segundo Costa (2006), já existem 48 espécies que estão distribuídas na Ásia, África e América Latina, onde 30 espécies podem ser encontradas no Brasil. Segundo Lewis *et al.* (2005), no Brasil existem 25 espécies que são tolerantes à seca, apresentam adaptação à solos de baixa fertilidade e são excelentes colonizadoras. É um dos gêneros mais importantes dentro da família, devido o seu uso na formação de pastos consorciados com gramíneas forrageiras em regiões tropicais. São cultivadas na América subtropical e na Austrália, no cenário brasileiro tem ganhado espaço devido seu valor nutricional e sua capacidade de persistência em campo (Ferreira & Costa, 1979).

No Mato Grosso do Sul existem 17 espécies que são organizadas em duas seções: *Stylosanthes*, com 12 espécies e *Styposanthes* com 5 espécies. Neste estado, estas espécies podem ocorrer em áreas de cerrado, cerradão, campo sujo e chaco (Costa *et al.*, 2008). Existem três principais espécies que possuem potencial de uso no cenário pecuário brasileiro: *Stylosanthes guianensis*, *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala* e a partir de linhagens dessas espécies, foram criadas cultivares que se encontram comercialmente no mercado (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).



Figura 1.1: *Stylosanthes* spp. em campo experimental. Foto: UniPro-FAO, 2017. In: <http://www.fao.org>.

1.1.2. Principais espécies e cultivares de *Stylosanthes*.

Atualmente, os dois principais cultivares provenientes das espécies *Stylosanthes capitata*, *Stylosanthes guianensis* e *Stylosanthes macrocephala*, desse gênero que se encontram no mercado são o estilosantes Mineirão e o Campo Grande, sendo que o cultivar Mineirão é tolerante à antracnose, principal doença que atinge o gênero (Silva, 2007 *apud* Souza *et al.*, 2013). É uma leguminosa que possui teores de proteína bruta que variam de 12-18%. Possui boa adaptação e desempenho nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste. É utilizado em pastagens consorciadas, banco de proteína, recuperação de pastagens e em associação com culturas como adubo verde (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

O cultivar Campo Grande é uma mistura entre *Stylosanthes capitata*, que é tolerante à antracnose e *Stylosanthes macrocephala*, que possui alta capacitação na recuperação de áreas degradadas. Foi desenvolvido pela Embrapa Gado de Corte em 2000 e é um cultivar que se desenvolve bem em solos com baixa fertilidade, por esse motivo, é recomendado a regiões de clima tropical e subtropical (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013). Danos causados por insetos não foram observados até o momento nesse cultivar. Leguminosas desse gênero dependem do processo de ressemeadura natural para persistirem no campo e também em consórcios com gramíneas (Barcellos *et al.*, 2001 *apud* Souza *et al.*, 2013).



Figura 1.2: Plantas (acima) e sementes (abaixo) de estilosantes multilinha Campo Grande (*Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*). In:<http://www.grupofacholi>.

1.1.3. Consórcio de *Stylosanthes* com gramíneas forrageiras

O consórcio entre gramíneas e leguminosas tropicais para a produção de ruminantes em pastos é algo ainda em fase de desenvolvimento. Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda existe um pequeno número de gramíneas e leguminosas compatíveis e persistentes, já que para obter sucesso no uso dessa tecnologia, é fundamental que a gramínea e a leguminosa escolhida, tenham características necessárias para obter um consórcio persistente, produtivo e resiliente (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

Sem dúvida, o melhoramento dessas plantas para o uso delas em pastos consorciados é bem mais complicado do que o uso normal (Souza *et al.*, 2013). De acordo com Caradus e William (1989), o comportamento da associação entre uma gramínea e uma leguminosa, só poderá ser analisado mediante o consórcio e sob o pastejo, pois será nesse momento, que fatores importantes como a competitividade, preferência, resistência ao pastejo e ao pisoteio serão mais bem avaliados. A persistência de leguminosas tropicais em pastos consorciados, já foi um problema no passado, porém, o objetivo das pesquisas era buscar enfatizar as melhores características dessas leguminosas em prol dessa persistência, sendo assim, buscar uma gramínea com características ideais para consórcio com cada variedade ou cultivar de leguminosa forrageira (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

No entanto, o sucesso dos pastos consorciados não depende apenas da persistência da leguminosa, a falta de compatibilidade com a gramínea é também um grande problema (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013). Segundo Collins e Rhodes (1989), essa compatibilidade pode ser definida como sendo a habilidade de duas espécies não só crescerem juntas como também produzirem boa quantidade e qualidade de forragem. Há muitos fatores que determinam a compatibilidade entre espécies, tais como: hábito e crescimento, palatabilidade, mecanismos para manutenção da população, tolerância à desfolha e ao pisoteio, plasticidade morfológica, resposta a limitações nutricionais, tolerância à seca ou o excesso de água no solo, competição por luz, espaço e padrão de sistema radicular, sendo o mais importante entre eles o hábito de crescimento (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

Segundo Mott (1983), existe uma diversidade quanto ao hábito de crescimento entre as leguminosas forrageiras tropicais, isso é algo importante, pois determina a resistência dessas plantas ao pastejo, sua persistência em campo e também a compatibilidade com diferentes gramíneas forrageiras. Alguns consórcios são harmônicos, porém, com baixa resiliência, é o caso de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão que é uma leguminosa que forma bons consórcios com gramíneas do gênero

Urochloa, mas devido sua persistência na pastagem acaba sendo afetada. Mesmo diante da problemática, ainda forma consórcios harmônicos com *Urochloa decumbens*, *Brachiaria brizantha* e *Andropogon gayanus* (Souza *et al.*, 2013).



Figura 1.3: Consórcio *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés e *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão. Foto: Vera Lúcia Banyas (UFG).

1.2. Vírus que infectam *Stylosanthes*

Ainda existem poucos relatos e estudos a respeito de infecções virais em plantas forrageiras no Brasil, assim como os danos econômicos por ela causados. Até o momento, são poucos os vírus relatados infectando naturalmente espécies do gênero *Stylosanthes*, porém, nenhum deles foi caracterizado. Os vírus que se destacam por infectar leguminosas forrageiras e também outros gêneros de plantas forrageiras são vírus bem disseminados pelo mundo e encontram-se classificados na família *Potyviriidae* (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Principais relatos de vírus da família *Potyviriidae* associados às espécies do gênero *Stylosanthes*.

Relato científico	Referência	Local de ocorrência
Infecção natural de <i>Arachis</i> e <i>Stylosanthes</i> por <i>Potyvirus</i> relacionado com <i>Peanut mottle virus</i>	Morales <i>et al.</i> , 1991	Colômbia
Mosaico em <i>Stylosanthes scabra</i> associado a um <i>Potyvirus</i>	Kitajima <i>et al.</i> , 1997	Brasil

1.3. Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* é muito importante, sendo a segunda maior família que atinge vírus de planta, sendo a família *Geminiviridae* a primeira. Do ponto de vista econômico, é importante por ser responsável por diversas doenças que afetam uma ampla gama de hospedeiras, seja monocotiledôneas ou dicotiledôneas (Adams *et al.*, 2011). Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses- ICTV* (2015), a família *Potyviridae* possui 195 espécies que estão distribuídas em oito gêneros. De acordo com Fauquet *et al.* (2005), a classificação de gênero dentro da família é de acordo com a gama de hospedeiros, organização genômica e vetor de transmissão.

As espécies dessa família possuem partículas filamentosas e flexuosas não envelopadas (Figura 1.1). Esses vírus podem ter o genoma monopartido ou bipartido. No caso dos monopartidos, que são a maioria dentro da família, eles possuem partícula que variam de 11-15 nm de diâmetro e 650-900 nm de comprimento e um genoma com um tamanho entre 8-11 kb. Os gêneros monopartidos são: *Brambyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus* (Adams *et al.*, 2011). Apenas um gênero é bipartido dentro da família, que é o gênero *Bymovirus*. Suas partículas medem de 11-15 nm de diâmetro, 250-300 nm de comprimento (no caso da menor partícula) e 500-600 nm de comprimento (no caso da maior partícula). Por ser bipartido, o genoma possui um RNA 1 que mede 7,5 kb e um RNA 2 que mede 3,5 kb (Adams *et al.*, 2011).

Os membros da família *Potyviridae* são compostos por uma molécula de RNA fita simples senso positivo, sendo essa fita protegida pela proteína da capa (CP). Ligada à sua extremidade 5' está a proteína VPg e à extremidade 3' uma cauda poliA (Figura 1.2). O RNA codifica uma poliproteína que é autoclivada liberando um conjunto de proteínas funcionais que desempenharão papéis fundamentais durante o ciclo de infecção viral. As análises da estrutura genômica dos vírus que formam a família, demonstraram que as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das proteínas funcionais são conservadas entre as espécies dentro da família (Adams *et al.*, 2011).

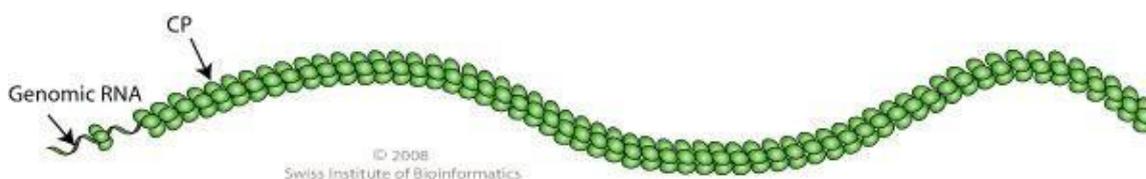


Figura 1.4: Esquema da partícula viral de membros da família *Potyviridae*. Partícula alongada e flexuosa com simetria helicoidal (adaptado: Viralzone, 2008).

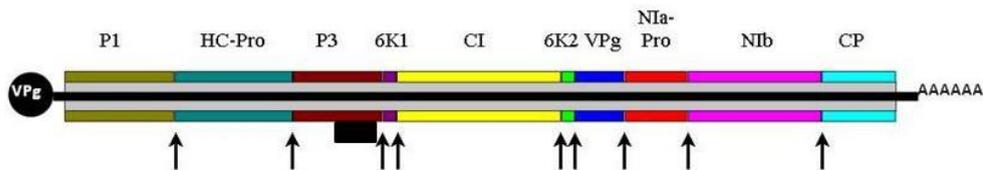


Figura 1.5: Organização genômica dos gêneros monopartidos da família *Potyviridae*. Poliproteína com nove sítios de clivagem que darão origem às proteínas funcionais. VPg e cauda poliA ligadas às extremidades 5' e 3' UTR, respectivamente. O retângulo preto abaixo da P3 representa a proteína PIPO (adaptado: DPVWeb, 2005).

O gênero *Brambyvirus* possui apenas uma espécie que é *Blackberry virus Y* (BVY) que foi descoberta infectando *Rubus*, um gênero pertencente à família Rosaceae. O vetor de BVY ainda é desconhecido. Esta espécie, é considerada bem diferente dos outros membros da família *Potyviridae* por possuir um domínio AlkB (Figura 1.3) na proteína P1 (Figura 1.2) (Susaimuthu *et al.*, 2008). Segundo Halgren *et al.* (2007), o domínio AlkB pode ser encontrado em vírus que infectam plantas da família Rosaceae, isso sugere que esse domínio pode ter função no reparo de danos de alquilação (metilação).

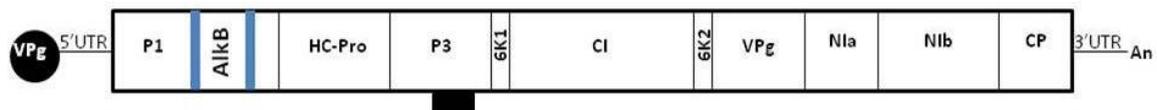


Figura 1.6: Representação do genoma de *Blackberry virus Y*. O domínio AlkB, que se encontra dentro da P1, está representado de azul. O retângulo preto embaixo da P3 representa a proteína PIPO.

Os membros do gênero *Ipomovirus* são distintos dos demais membros da família, devido a sua organização genômica e também pelo fato de serem transmitidos por mosca branca (*Bemisia tabaci*). É um gênero composto por seis espécies, cuja espécie tipo é *Sweet potato mild mottle virus* e sua organização genômica é semelhante a de outros membros da família *Potyviridae*. No caso de *Squash vein yellowing virus* (SqVYV) e *Cassava brown streak virus* (CBSV), eles carregam características genômicas bem distintas entre eles, a espécie tipo do gênero e outros membros dentro da família. A proteína P1 de SqVYV, possui duas cópias (P1a e P1b) que possuem a função de supressora do silenciamento gênico e a proteína HC-Pro, que geralmente é responsável por essa função, é ausente. Em CBSV a proteína P1 é igual a da espécie tipo, porém, a HC-Pro é ausente (Figura 1.4) (Valli *et al.*, 2006).

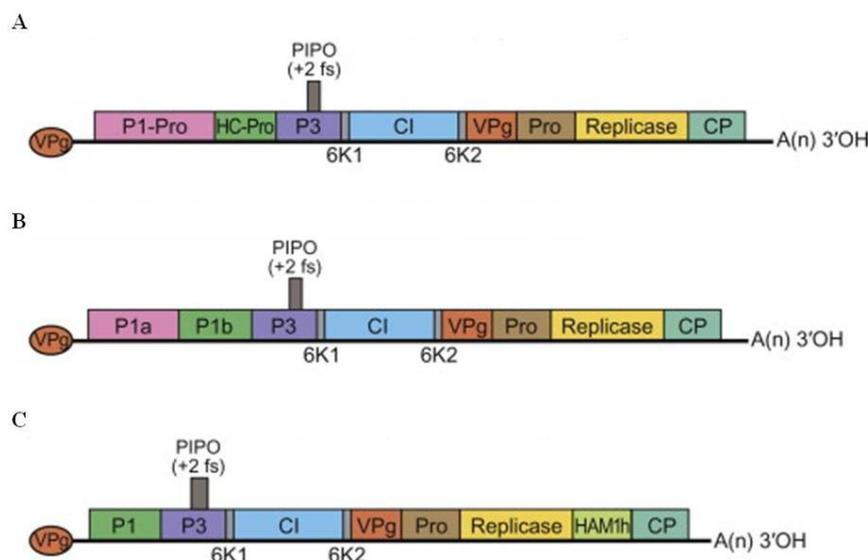


Figura 1.7: Organização genômica de membros do gênero *Ipomovirus*. Diferença entre as proteínas P1 das espécies *Sweet potato mild mottle virus* (A), *Squash vein yellowing virus* (B) e *Cassava brown streak virus* (C) (adaptado: ScienceDirect, 2012).

O gênero *Macluravirus* possui seis espécies, cuja espécie tipo é *Maclura mosaic virus*. São os menores dentro da família e bem distintos filogeneticamente devido diferenças em seus sítios de clivagem. A transmissão é por afídeos. É um gênero pouco estudado, possuem duas proteínas diferentes, 7K e 9K, que têm as mesmas funções que 6K1 e 6K2 nos demais vírus da família. A proteína P1 é ausente, portanto possuem oito sítios de clivagem (Figura 1.5) (Adams *et al.*, 2011).

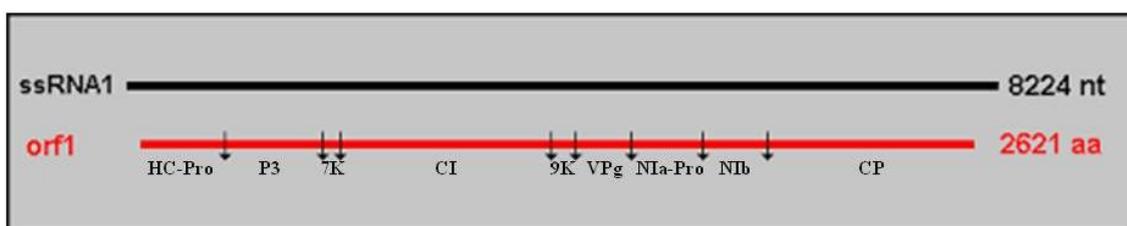


Figura 1.8: Organização genômica de uma espécie do gênero *Macluravirus*. Genoma de aproximadamente 8kb do *Chinese yam necrotic mosaic virus* apresentando oito sítios de clivagem que dão origem a nove proteínas funcionais (adaptado: DPVWeb, 2005).

O gênero *Potyvirus* possui 162 espécies aceitas pelo ICTV, sendo este, o mais numeroso dentro da família e que atingem uma ampla gama de hospedeiras, sendo também, responsáveis por perdas econômicas significativas. São vírus que podem ser transmitidos por afídeos, mas também de forma mecânica e por sementes. A espécie tipo do gênero é *Potato virus Y*, um dos vírus mais estudados dentro da família. Os *Potyvirus* possuem 10 proteínas funcionais com nove sítios de clivagem (Figura 1.6) (Adams *et al.*, 2011).

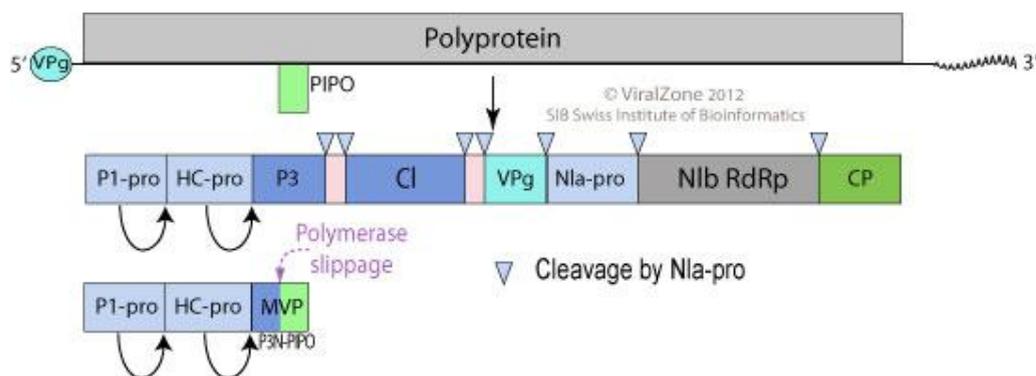


Figura 1.9: Organização genômica do gênero *Potyvirus*. O genoma monopartido medindo aproximadamente 10 kb. Poliproteína com nove sítios de clivagem que darão origem às proteínas funcionais (adaptado: Viralzone, 2008).

O gênero *Rymovirus* possui três espécies aceitas que podem ser transmitidas mecanicamente ou pelo ácaro *Abacarus hystrix*. Esse ácaro é responsável pela transmissão da espécie tipo *Ryegrass mosaic virus* e também do *Agropyron mosaic virus*. Para a espécie *Hordeum mosaic virus*, não se tem conhecimento sobre a forma de transmissão. A organização do genoma assemelha-se a outros membros monopartidos como os *Potyvirus* (Adams *et al.*, 2011). As espécies do gênero *Tritimovirus* também são transmitidas por ácaros assim como os *Rymovirus*, porém, da espécie *Aceria tulipae*. O gênero é composto por seis espécies e *Wheat streak mosaic virus* é a espécie tipo. Alguns vírus que fazem parte desse gênero, já pertenceram ao gênero *Rymovirus*, porém, com base na identidade de nucleotídeo da CP, hoje, esses vírus fazem parte do gênero *Tritimovirus*. Quanto à estrutura genômica, assemelham-se aos *Potyvirus* assim como os *Rymovirus* (Adams *et al.*, 2011). O gênero *Poacevirus* atingem hospedeiras da família Poaceae e também são transmitidos por ácaro, porém, da espécie *Aceria tosichella*. São filogeneticamente bem distintos dos demais gêneros, pois possuem a região 5' UTR maior do que os demais membros da família *Potyviridae*. Esse gênero possui três espécies descritas e *Triticum mosaic virus* é a espécie tipo (Tatineni *et al.*, 2009).

O gênero *Bymovirus* é o único que possui genoma bipartido dentro da família. Possuem duas moléculas de RNA que sofrem clivagem e dão origem a 10 proteínas funcionais (Figura 1.7). O RNA 1 é maior e é parecido com a poliproteína das espécies com genoma monopartido, exceto pela ausência de algumas proteínas (HC-Pro) e presença de outras novas como 7K e 14K que desempenham funções ligadas à replicação viral. No RNA 2 encontra-se uma proteína diferente, a P2 que está envolvida na transmissão do vírus pelo fungo *Polymyxa graminis* e também na supressão do silenciamento gênico. A espécie tipo é o vírus *Barley yellow mosaic virus* (Adams *et al.*, 2011).

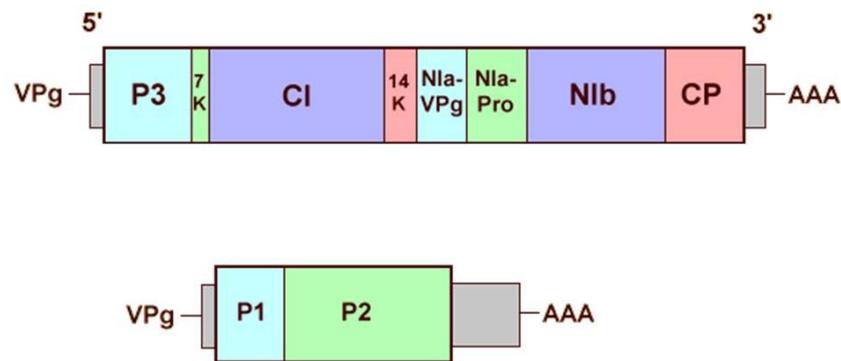


Figura 1.10: Organização genômica da espécie tipo do gênero *Bymovirus*. Genoma bipartido com duas poliproteínas que se autoclivam dando origem a 10 proteínas funcionais. Na extremidade 3' tem uma cauda poli (A) e na extremidade 5' possui uma proteína ligada ao genoma, a VPg (adaptado: DPVWeb, 2005).

A poliproteína dos membros da família *Potyviridae* é processada através das seguintes proteases codificadas pelos vírus: P1, HC-Pro (exceto *Ipomovirus* e *Bymovirus*) e Nla-Pro. A P1 e HC-Pro autoclivam-se em *cis*, já a Nla atua de duas maneiras: na própria clivagem em *cis* e em seis clivagens em *trans* (Daros & Carrington, 1997). Após a autoclivagem da poliproteína, serão produzidas proteínas multifuncionais em quantidades exatamente iguais. Contudo, esta produção não é dependente da quantidade necessária requisitada pelo vírus, ou seja, a produção de determinada proteína pode ser gerada em excesso podendo ocasionar acúmulos nas células infectadas (Shukla *et al.*, 1994). A proteína P1 além de ser uma protease, é responsável pela sintomatologia, sua massa molecular pode variar de 32 kDa a 64 kDa, variando de acordo com cada espécie e determinado gênero (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). A proteína HC-Pro é multifuncional, sendo responsável também pela transmissão por afídeo, movimento sistêmico, sinergismo com outros vírus, desenvolvimento de sintomas e supressão do silenciamento gênico, sua massa molecular pode variar de 56 kDa a 58 kDa (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). As proteínas P3, com massa molecular de 38 kDa e 6K2 com 6 kDa, são responsáveis pela patogenicidade e ligação do complexo viral de replicação do genoma, respectivamente (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). A proteína 6K1, com massa molecular de 6 kDa, possuía, até pouco tempo, sua função desconhecida, porém, um estudo realizado por Cui & Wang (2016), mostraram que a 6K1 é necessária para a replicação viral e é um elemento importante na fase de infecção precoce. A proteína CI possui massa molecular de 70 kDa e é responsável pela formação dos corpos de inclusão citoplasmática, além da função ATPase/RNA helicase e movimento célula-célula (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). A VPg, que pode variar de 21 kDa a 24 kDa, funciona como um *primer* para a replicação ao interagir com fatores de tradução eIF4E e assim como a HC-Pro, também está envolvida com a supressão do silenciamento gênico (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). Nla-Pro possui uma massa molecular de 49 kDa e é responsável pela interação proteína-proteína, já a

proteína NIB possui 58 kDa e é responsável pelos corpos de inclusões nucleares, além de ter a função de RNA polimerase dependente de RNA e está envolvida na replicação do genoma (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001). Já a proteína da capa protéica é a mais abundante, pois envolve todo o material genômico dos vírus. Possui um peso que varia de 28 kDa a 40 kDa e é responsável pelo movimento viral, amplificação do genoma e transmissão do vetor (Urcuqui-Ichima *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2008).

Os critérios para a demarcação de novas espécies dentro da família são: sequências de aminoácidos da CP menor que 80% de identidade, sequência de nucleotídeo da CP menor que 76% de identidade, além das diferenças no sítio de clivagem da poliproteína, gama de hospedeiros, patogenicidade, forma de transmissão e citopatologia (Adams *et al.*, 2011). O método sorológico é uma ferramenta comumente utilizada para a detecção de vírus de plantas, porém, tem provado não ser satisfatória quando aplicada à família *Potyviridae*, isso ocorre devido a presença de reação cruzada variável entre antissoros produzidos em diferentes laboratórios para um mesmo vírus (Riedel *et al.*, 1998).

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

As tecnologias de sequenciamento de alto desempenho tornaram-se viáveis no início do século XXI. Fornecem um DNA altamente eficiente, rápido e de baixo custo. A plataforma tradicional de sequenciamento de DNA foi desenvolvida no final dos anos 70. Desde então, outras plataformas foram surgindo e têm sido melhoradas para se tornarem mais rápidas, eficientes e baratas (Barba *et al.*, 2014). Elas têm sido utilizadas em muitos campos da biologia desde 2004. A partir do ano de 2005 foram desenvolvidas e implementadas novas tecnologias de sequenciamento de nucleotídeos conhecidas como sequenciamento de alto desempenho (*Next Generation Sequencing*- NGS) (Barzon *et al.*, 2013).

A grande vantagem dessas novas técnicas foi a possibilidade de gerar muitas sequências em um curto espaço de tempo. Dessa forma, o rendimento obtido em apenas uma etapa de sequenciamento era superior e apresentava baixo custo. As plataformas de sequenciamento por NGS são capazes de determinar as sequências de nucleotídeos com base em fragmentos de DNA a partir de uma biblioteca genômica que é gerada. Dessa forma, pode-se evitar a clonagem desses fragmentos em vetores plasmidiais para serem sequenciados (Barzon *et al.*, 2013).

Essa técnica tem contribuído bastante em muitas áreas da ciência e análises clínicas, isso se deve ao fato de ser uma técnica que produz uma grande quantidade de leituras (*reads*) de DNA com tamanhos variados (entre 25-400 bp). Essas leituras são menores quando comparadas com as leituras geradas pelo sequenciamento por Sanger

(entre 300-750 bp), porém, conforme a evolução da tecnologia, ocorre a possibilidade de se produzir sequências maiores e mantendo o baixo custo (Radford et al., 2012). Novas tecnologias foram disponibilizadas no mercado, assim como, plataformas inovadoras estão sendo desenvolvidas para aperfeiçoar o processo de sequenciamento via NGS (Barba *et al.*, 2011).

Tabela 1.2: Principais métodos atuais de tecnologias de sequenciamento de DNA. Plataformas de sequenciamento de nova geração e as principais características de cada uma (adaptado de Barba *et al.*, 2014).

Plataforma de sequenciamento	Método de amplificação	Química de sequenciação	Reads (bp)	Velocidade	Precisão (%)
454 (Roche)	PCR de emulsão	Pirosequenciamento	400-700	13Mbp	99,9
Illumina (Illumina)	PCR de ponte	Terminadores reversíveis	100-300	25Mbp	99,9
SOLID (Life technologies)	PCR e emulsão	Ligação	75-85	21-28Mbp	99,9
PacBio (Pacific Biosciences)	Sem amplificação- molécula única (SMRT)	Marcação de nucleotídeos por fluorescência	4000-5000	50-115Mbp	95
Helicos (Helicos Biosciences)	Sem amplificação-molécula única	Erminadores reversíveis	25-55	83Mbp	97
Ion Torrent (Life Technologies)	PCR de emulsão	Detecção de H liberado	100-400	23Mbp-16Gbp	99
Nanopore (Oxford Technologies)	Sem amplificação-molécula única	-	Lê até 50Kbp	150Mbp	98

Tabela 1.3: Aplicações gerais dos principais métodos atuais de tecnologias de sequenciamento de DNA. Dentro de cada método existem modelos variados e as aplicações também vão variar (adaptado de Barba *et al.*, 2014).

Plataforma de sequenciamento	Aplicações
454 (Roche)	Sequenciamento do genoma completo, resequenciamento de grandes genes em uma única corrida, sequenciamento de RNA e transcriptoma
Illumina (Illumina)	Sequenciamento de DNA, epigenético, imunoprecipitação de cromatina, análise de metilação, sequenciamento de RNA e análise de transcriptoma
SOLID (Life technologies)	Sequenciamento de DNA, genoma completo, epigenética e sequenciamento de RNA
PacBio (Pacific Biosciences)	Sequenciamento de DNA utilizando o sistema de molécula única em tempo real (SMRT) com comprimentos de <i>reads</i> mais longos.
Helicos (Helicos Biosciences)	Sequenciamento de DNA e RNA
Ion Torrent (Life Technologies)	Sequenciamento de RNA
Nanopore (Oxford Technologies)	Sequenciamento de DNA, epigenético, caracterização da variação genética e sequenciamento de RNA

Existem diferenças entre uma metodologia e outra e que estão relacionadas com as reações bioquímicas do processo, acarretando em diferenças entre protocolos de sequenciamentos, no rendimento final e no tamanho das sequências produzidas (Barzon *et al.*, 2013). Concomitantemente ao aperfeiçoamento das estratégias de sequenciamento, veio a necessidade por novas e variadas ferramentas de bioinformática (Barba *et al.*, 2014). A capacidade de gerar um grande número de dados é uma característica do NGS. Portanto, o desafio agora é a interpretação dos dados que são gerados, para isso é necessário recursos computacionais e sua aplicabilidade à testes de diagnóstico (Barzon *et al.*, 2011). Em 2009, as tecnologias de sequenciamento de nova geração passaram a ser aplicadas nos campos de virologia de plantas, incluindo sequenciamento de genoma de vírus e viróides, como também suas descobertas e detecção (Barba *et al.*, 2014).

Na área da virologia vegetal, essa técnica permite descobertas de novas espécies e gêneros auxiliando em estudos de epidemiologia, ecologia, diversidade e transcriptomas (Howell *et al.*, 2011). Atualmente existem diversas técnicas de detecção e identificação de vírus que variam desde os mais tradicionais como: microscopia eletrônica, inoculação em plantas hospedeiras e testes sorológicos; até os mais modernos e sofisticados como: testes moleculares e microarranjos (Gibbs & Mackenzie, 1997; James *et al.*, 2006). Todas essas técnicas são notáveis, mas apresentam desvantagens quando o objetivo é identificar patógenos desconhecidos. Através da técnica do NGS que permite obter um grande número de sequências com custo acessível, possibilitou-se o estudo da metagenômica para a identificação de novas espécies virais à curto prazo (Quan *et al.*, 2008). Apesar de toda a importância e eficiência, a metagenômica requer tempo e esforço. A variação de espécies virais pode ser um entrave, para solucionar esse problema, necessita-se reavaliar os *primers* e as condições de PCR (Marston *et al.*, 2013).

Na virologia vegetal o uso do NGS revela que as doenças podem ser causadas tanto por novos vírus, quanto por aqueles poucos caracterizados e quando essa técnica for utilizada juntamente com bioinformática que auxiliará na interpretação dos dados gerados, o objetivo final pode ser alcançado com sucesso. Essa ferramenta pode ser utilizada em programas de certificação de plantas e de quarentena, visando o controle do vírus e doenças, seja a nível nacional e internacional (Barba *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE VÍRUS DA FAMÍLIA *POTYVIRIDAE* INFECTANDO LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS DA ESPÉCIE *STYLOSANTHES GUIANENSIS*

2.1.. INTRODUÇÃO

Stylosanthes é uma leguminosa que pertence à família Fabaceae. É originária da América Latina, porém, o país de origem desse gênero é algo ainda muito duvidoso. A espécie se desenvolve em temperatura média de 18°C, em solos degradados e com pouco regime de chuva (Lewis *et al.* 2005). As plantas são herbáceas arbustivas ou subarbustivas, perenes que possuem diversas espécies com morfologia variada (Karia & Andrade, 1996). O *Stylosanthes* é rico em proteínas e possui um papel importante no ciclo biológico do nitrogênio, já que possui a capacidade de captar essas moléculas da atmosfera e fixá-las ao solo, dessa forma, essa leguminosa torna-se importante na recuperação de áreas degradadas (Andrade *et al.*, 2010).

Existe alguns cultivares dessa leguminosa disponível no mercado, porém, duas são destaque: Campo Grande e Mineirão, sendo o primeiro mais usado. Esta leguminosa é utilizada em consórcio com gramíneas, aumentando o teor de proteína bruta ingerida pelos animais. Alguns relatos de pesquisadores e produtores descrevem o aumento significativo de sintomas de mosaico e clorose em plantas de estilosantes em pastagens e campos experimentais, sintomas esses semelhantes aos causados por vírus (Andrade, 2013 *apud* Souza *et al.*, 2013).

No entanto, as informações a respeito de infecções virais em leguminosas forrageiras ainda são extremamente escassas, assim como, o desconhecimento dos agentes etiológicos de doenças virais nesse grupo de plantas no Brasil. Essa falta de informação demonstra a necessidade de realizar-se um levantamento desses patógenos em áreas de pastagens. Nos últimos anos, como mencionado no capítulo anterior, observou-se em campo, a ocorrência de sintomas típicos de infecções virais como: mosaico, amarelecimento generalizado e nanismo, em estilosantes, associados à vírus da família *Potyviriidae* (Verzignassi & Fernandes. 2001).

A família *Potyviriidae* é a segunda maior família de vírus de planta e do ponto de vista econômico é uma família muito importante, pois é responsável por diversas doenças que atingem uma ampla gama de hospedeiras, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas (Hull, 2002). De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), a família *Potyviriidae* possui 195 espécies aceitas que estão distribuídas em 8 gêneros (*Brambyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus* e *Bymovirus*) (Adams *et al.*, 2011).

Sendo assim, partindo do pressuposto de que os sintomas observados em leguminosas do gênero *Stylosanthes*, presentes em campos naturais, cultivados e/ou experimentais,

são sintomas virais semelhantes aos causados por membros da família *Potyviridae*, este trabalho visou identificar e caracterizar tanto biologicamente quanto molecularmente alguns dos vírus presentes em *Stylosanthes guianensis*.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Obtenção das amostras de *Stylosanthes* infectadas por novos membros da família *Potyviridae*

Folhas de plantas de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão com sintomas de vírus foram coletadas na Embrapa Gado de Corte (CNPGC), no Estado do Mato Grosso do Sul, em março de 2013. As plantas sintomáticas coletadas representam genótipos que fazem parte do banco de germoplasma do programa de melhoramento de plantas forrageiras da Embrapa-CNPGC. A Figura 2.1 ilustra os sintomas observados nas folhas de plantas infectadas em campos de melhoramento genético de *Stylosanthes guianensis*.



Figura 2.1: Sintomas virais em amostra de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão. Sintomas de mosaico e pontuações cloróticas típicos daqueles causados por infecção viral. Estes sintomas foram observados em outros genótipos dos bancos ativos de germoplasmas da Embrapa Gado de Corte- MS (Mato Grosso do Sul).

2.2.2. Purificação parcial de partículas virais

A purificação parcial de vírus foi realizada com o objetivo de concentrar em pequenos volumes, partículas virais com formato icosaédrico e flexuoso. Duas amostras de *Stylosanthes guianensis* descritas na Tabela 2.1, foram maceradas com nitrogênio líquido, tampão fosfato de potássio 0,1 M e EDTA 1 mM e adicionou-se 200 μ L de β -mercaptoetanol (0,2%). Em seguida foram filtradas com gaze e centrifugadas por 20 min a 5.000 rpm (3.836 xg) em uma centrífuga preparativa. Formou-se um sobrenadante que foi transferido para 2 tubos de ultracentrífuga e uma solução de sacarose 30% (20 mL) foi adicionada para a formação do colchão de sacarose que foi centrifugado a 33.000 xg por 2 horas. Após a purificação parcial de partículas virais, o RNA foi extraído com o kit RNeasy plant mini kit (Qiagen) seguindo recomendações do fabricante. Após a extração do RNA, as amostras foram misturadas formando uma amostra composta e enviada para o sequenciamento via NGS.

Tabela 2.1: Dados das amostras biológicas de *Stylosanthes guianensis* utilizadas no sequenciamento de alto desempenho. Plantas infectadas utilizadas para o isolamento de RNA viral e sequenciamento do genoma completo de novos membros da família *Potyviridae* infectando estilosantes.

Nome Original	Código Banco Germoplasma (CNPGC*)	Sintomas
<i>Stylosanthes guianensis</i>	GC 5559	Mosaico amarelo severo com deformações foliares (sintomas apenas em folhas jovens)
<i>Stylosanthes guianensis</i>	GC 4364	Mosaico amarelo moderado (apenas em folhas jovens) sem deformação foliar

*CNPGC: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte

2.2.3. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática

As amostras foram sequenciadas na Macrogen INc. (Coréia), utilizando a tecnologia *Illumina* HiSeq 2000. As sequências obtidas (*reads*) foram montadas usando o programa CLC Genomics Workbench 7.0. A partir disso *contigs* foram obtidos e submetidos à uma análise no programa BLASTX contra o banco de dados viral RefSeq (GenBank). Analisou-se o genoma utilizando o programa Geneious 9.1. Sequências foram geradas e a partir disso e após a identificação dos novos vírus de estilosantes nas amostras sequenciadas pertencentes à família *Potyviridae*, foram sintetizados *primers* específicos para a detecção dos vírus nas plantas selecionadas para o estudo e outras amostras sintomáticas.

2.2.4. Detecção das regiões 3' UTR, capa protéica (CP) e inclusão nuclear (NIB) de membros da família *Potyviridae* por RT-PCR nas plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho

A partir do consenso obtido com base no genoma viral, as regiões 3' UTR, os genes da CP e da NIB foram selecionados detectados com o uso de *primers* específicos destinados ao diagnóstico de novos membros da família *Potyviridae* por RT-PCR em *Stylosanthes guianensis*. As folhas de *Stylosanthes guianensis* (100 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído usando o kit RNeasy plant mini kit

(Qiagen), seguindo instruções do fabricante. O cDNA desses novos vírus foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa do kit SuperScript III (Invitrogen), a partir dos *primers* randômico e oligodT 17 M10 (Chen et al., 2001): 5' TCTGCCTTGATAAACTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 5 µL de RNA total 1 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL do *primer* oligodT 17 (10 mM) e 0,5 µL (10 mM) de *primer* randômico, com 5 minutos de incubação a temperatura de 65°C para abrir a fita de RNA. Foi adicionado 2 µL de 5X First-Strand Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,3); 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂], 1 µL de DTT (0,1 M), 0,5 µL da enzima SuperScript III (200 U/µL) e 0,5 µL de RNaseOut (40 U/µL). Foi utilizada uma temperatura de incubação de 55°C, depois por um período de incubação de 70°C por 15 minutos para inativar a enzima. A enzima utilizada para a realização da PCR foi a Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* específicos utilizados na PCR juntamente com o M10 5' AAGCAGTGTATCAACGCAGA 3' (Chen et al., 2001) foram: B4828FW- 5' TGGAACAACACTGCAATATGAGCA 3'; B_1_420FW- 5'GAGCCAACGTACCATACAGA 3' e R8405FW- 5'ATGAACTGCGAGAGTTCCTC 3'. Para a reação de PCR utilizou-se 0,5 µL (10 mM) de cada um dos *primers*, 2,5 µL de 10X PCR Buffer, 0,75 µL de (50 mM) MgCl₂, seguida de 0,5 µL (10 mM) de dNTP, 0,2 µL (5 U/µL) de Taq DNA Polymerase Platinum, 2,5 µL do cDNA e 17,55 µL de H₂O, para uma reação de final de 25 µL. O programa utilizado para a realização da PCR encontra-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Condições usadas na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a detecção dos novos membros da família *Potyviridae* encontrados em *Stylosanthes guianensis*. Amplificação do terminal 3' UTR, cauda poli-A e dos genes da capa protéica (CP) e inclusão nuclear (NIb).

	Etapa	Temperatura °C	Tempo
	Desnaturação	94	3 min
35 ciclos	Desnaturação Inicial	94	30 seg
	Anelamento	55	30 seg
	Extensão Inicial	72	1 min
	Extensão	72	5 min
	Espera	12	∞

2.2.5. Preparo de células competentes *Escherichia coli* DH10 β e clonagem das regiões 3'-UTR, capa protéica (CP) e inclusão nuclear (NIb) de membros da família *Potyviridae* detectados por RT-PCR nas plantas utilizadas no sequenciamento de alto desempenho

Os fragmentos obtidos na PCR de aproximadamente 1,3 kb para *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*, e 1,8 kb para *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, foram eluídos do gel de agarose utilizando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, foram clonados em pGEM-T Easy vector (Promega) (Figura 2.2) e a reação de ligação do fragmento amplificado foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de ligação foi realizada utilizando: 1 μ L de pGEM-T Easy Vector (50 ng/ μ L), 5 μ L de tampão de ligação 2 X, 1 μ L da enzima T4 DNA ligase (3 U/ μ L) e de 1,5-3 μ L do fragmento amplificado em um volume final de 10 μ L. Após esse procedimento, a reação foi incubada a 4°C por 16 horas. Células competentes de *Escherichia coli* DH10 β foram preparadas para serem utilizadas na transformação. As células competentes DH10 β , contêm o marcador lacZ promovendo a seleção de colônias brancas/azuis em placas de ágar com X-gal. Primeiramente, riscou-se uma placa com as células DH10 β (estoque -80°C) em meio de cultura LB sem antibiótico que cresceram por 16 horas a 37°C. Após esse tempo, três colônias foram escolhidas, isoladas e colocadas para crescer em meio de cultura LB líquido (5 mL) sem antibiótico por 16 horas a 37°C e sob agitação de 200 rpm. Em seguida, escolher uma entre as três colônias isoladas e colocar 50 μ L em 100 mL de meio de cultura LB a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. Transferiu-se 100 mL da cultura para 900 mL de LB sem antibiótico. Incubar a 30°C a 200 rpm até OD - 0.4 e incubou-se no isopor com gelo por 30 minutos. Transferiu-se para tubos de 50 mL estéreis e centrifugou-se a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1L de água gelada. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições e descartado o sobrenadante. A lavagem foi repetida com 500 mL de água e o sobrenadante foi descartado e ressuscitado em 20 mL de glicerol 10% gelado. Centrifugou-se a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e ressuscitado em 2 mL de glicerol 10% gelado. Foram feitas alíquotas de 40 μ L em microtubos estéreis, essas alíquotas foram resfriadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Após a ligação, os DNAs foram precipitados com N-butanol e uma alíquota de 2 μ L foi aplicada em 40 μ L de células competentes de *Escherichia coli* DH10 β para transformação por eletroporação e imediatamente foi adicionado 860 μ L de meio LB líquido (solução autoclavada de 5 g NaCl, 5 g triptona e 2,5 g extrato de levedura, em 500 mL de água destilada, a pH 7,5) e incubou-se por 1 hora a 37°C. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido (LB líquido

adicionado de ágar bacteriológico) com ampicilina (100 µg/mL) e, em seguida, adicionado e plaqueado na superfície, 40 µL de X GAL (20 mg/mL) e 10 µL de IPTG (100 mM) por placa. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Todos os procedimentos seguiram as recomendações dos fabricantes e indicações que se encontram em Sambrook *et al.*, (1989).

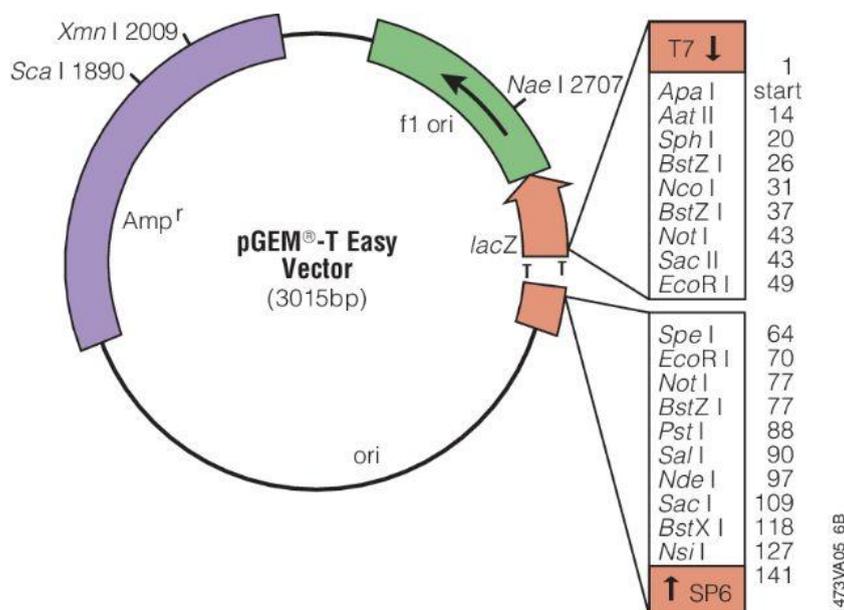


Figura 2.2: Esquema representativo do vetor plasmidial pGEM-T Easy Vector (Promega). O vetor comercial usado para a clonagem de fragmentos de PCR.

2.2.6. Isolamento da região 5'-UTR do genoma dos novos membros da família *Potyviridae* através do método RACE (*Rapid Amplification cDNAs End*).

Para amplificar a região 5' utilizou-se o kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O 5' RACE é uma técnica cujo objetivo é amplificar por RT-PCR a região 5' não conhecida de um mRNA com base nos fragmentos internos de uma sequência conhecida. Primeiramente o cDNA é sintetizado usando um *primer* reverso. Uma sequência com muitas repetições, neste caso de citidina (citosina) é adicionada à extremidade 3' com a enzima Terminal Desoxinucleotídeo Transferase (TdT). A partir dessa fita, a primeira PCR é feita com um segundo *primer* específico, mais interno ao primeiro e outro *primer* que seja complementar à região adicionada. Esse *primer* possui uma região âncora que será utilizada na próxima etapa (*primer* AAP-Poli G). Na segunda PCR (próxima etapa), um terceiro *primer* específico, mais interno ao segundo é utilizado juntamente com um *primer* AUAP irá se anelar à região âncora da primeira PCR. Para a técnica de 5' RACE, folhas com sintomas de vírus de *Stylosanthes guianenses* foram utilizadas para a extração de RNA total empregando-se o kit RNeasy plant mini kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa

SuperScript III (Invitrogen), e os *primers* específicos utilizados tanto para a síntese do cDNA quanto para as etapas de PCR foram para Stylosanthes mosaic associated virus 1: Poty1_609R 5' TGATGATGTTTTCTCCAATGCCTT 3', Poty1_428R 5' ACTCCCTGATTTTACGCTCTTTTC 3' e Poty1_275R 5' ATTCTTAAATGGACAATGTGGGCAC 3'; para Stylosanthes mosaic associated virus 2: Poty2_553R 5' ATCATCAACCTTAATGAGTGCATCCATAC 3', Poty2_454R 5' AGTGTACTIONCCTTGAAAGTTGGCTTG 3' e Poty2_333R 5' TGCTTAATCTTTGCTTTCTGCTCATGG 3'; e para Stylosanthes mosaic associated virus 3: Rose402R 5' ATGGTGCTTGGCTTGGACAC 3', Rose370R 5' GTTGGACAGTAGGACAGCCC 3' e Rose205R 5' ACAGCGTTGTAAGCCTTCGA 3'.

A reação de transcrição reversa, para cada um dos vírus, foi realizada utilizando 5 µL de RNA total, 0,5 µL dos *primers* Poty1_609R, Poty2_553R e Rose402R (50 µM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), e foi incubada a 75°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 2 µL do tampão de enzima 5X First-Strand Buffer, 1 µL de DTT (0,1 M), 0,5 µL de RNaseOUT (40 U/µL, Invitrogen) e 0,5 µL da enzima SuperScript™ III RT (200 U/µL) em um volume final de 10 µL. Depois, a amostra foi incubada a 52°C por 1 hora para a síntese do cDNA e 75°C por 15 minutos para a desativação da enzima. Em seguida, foi adicionado 0,5 µL de RNase H para descartar o RNA molde pareado com o DNA complementar sintetizado e 0,5 µL de RNase A para eliminar qualquer RNA presente na solução e incubada a 37°C por 30 minutos. Após a síntese da fita dupla, foi feita uma purificação utilizando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare) antes da síntese da sequência de desoxicitidina. Para a síntese da sequência de citidina (citossina), a reação foi composta de 2 µL de 10X Terminal Transferase Reaction Buffer, 2 µL de CoCl₂ (2,5 mM), 15,5 µL de cDNA, 0,5 µL de dCTP (10 mM). Depois, a reação foi incubada a 94°C por 2 minutos, posteriormente, colocada no gelo por 3 minutos, depois, foi adicionado 0,25 µL de Terminal Transferase (20 U/µL). Foi incubada a 37°C por 30 minutos e 70°C por 10 minutos para a desativação da enzima. Esta reação foi utilizada nas etapas posteriores de PCR. Todas as amplificações foram realizadas de acordo com o kit 5' RACE (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante utilizando a Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) para a amplificação dos fragmentos, um *primer* específico mais externo ao genoma e um *primer* âncora que se liga à cauda dCTP criada, permitindo dessa maneira, o resgate da posição 5' viral. Para a amplificação dos fragmentos de PCR, utilizou-se 0,5 µL de cada um dos *primers*, 2,5 µL de 10X PCR Buffer, 0,75 µL (50 mM) MgCl₂, seguida de 0,5 µL de dNTP, 0,2 µL de Taq DNA Polymerase Platinum, 2,5 µL do cDNA e 17,55 µL de H₂O, para uma reação final de 25 µL. As condições da PCR utilizadas nesta etapa estão descritas na Tabela 2.3. No final, foi feito um gel de agarose a 1,5% para visualização dos fragmentos amplificados.

Tabela 2.3: Condições usadas na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizadas para a detecção dos novos membros da família *Potyviridae* encontrados em *Stylosanthes guianensis*. Amplificação do terminal 5' UTR.

	Etapa	Temperatura °C	Tempo
	Desnaturação	94	2 min
35 ciclos	Desnaturação Inicial	94	30 seg
	Anelamento	60	30 seg
	Extensão Inicial	72	1 min
	Extensão	72	10 min
	Espera	12	∞

A partir da RT-PCR, foram obtidos fragmentos de aproximadamente 250 pb e 350 pb. Esses fragmentos foram eluídos e clonados de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.5.

2.2.7. Análises filogenéticas das sequências de nucleotídeos e aminoácidos de membros da família *Potyviridae*

As sequências nucleotídicas completas obtidas por NGS, foram analisadas e editadas utilizando-se o programa Geneious 9.1. Foram alinhadas com sequências de outros vírus da família *Potyviridae* disponíveis no banco de dados do GenBank (Tabela 2.5) utilizando o programa MAFFT v. 7. 222 e as árvores filogenéticas das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram construídas utilizando o programa Fast Tree. Para análise das proteínas funcionais, foram utilizadas sequências de aminoácidos e nucleotídeos dos isolados de *Stylosanthes guianensis* juntamente com sequências de referência (RefSeq) das espécies tipo dos vírus pertencentes aos oito gêneros da família *Potyviridae* depositas no GenBank, que estão descritos na Tabela 2.4. O programa SDT (*Sequence Demarcation Tool*) (Muhire *et al.*, 2014) foi utilizado para a construção da matriz de identidade por escala de cores para visualização de níveis de identidade entre as sequências analisadas das proteínas CI, CP, HC-Pro e NIb.

Tabela 2.4: Sequências das espécies tipo de cada um dos gêneros da família *Potyviridae*. Foram utilizadas apenas nove espécies da família *Potyviridae* nas análises de identidade de aminoácidos e nucleotídeos de todas as proteínas funcionais.

Espécies*	Acrônimo	Gênero
<i>Sweet potato mild mottle virus</i>	SPMMV	<i>Ipomovirus</i>
<i>Triticum mosaic virus</i>	TriMV	<i>Poacevirus</i>
<i>Wheat streak mosaic virus</i>	WSMV	<i>Tritimovirus</i>
<i>Ryegrass mosaic virus</i>	RgMV	<i>Rymovirus</i>
<i>Potato virus Y</i>	PVY	<i>Potyvirus</i>
<i>Blackberry virus Y</i>	BVY	<i>Brambyvirus</i>
<i>Chinese yam necrotic mosaic virus</i>	ChYNMV	<i>Macluravirus</i>
<i>Barley yellow mosaic virus</i>	BaYMV	<i>Bymovirus</i>
<i>Rose yellow mosaic virus</i>	RoYMV	Sem gênero

*: Espécies escolhidas para representar cada um dos oito gêneros distribuídos dentro da família *Potyviridae*.

Tabela 2.5: Sequências das espécies da família *Potyviridae*. Foram utilizadas 44 espécies dentro de cada um dos oito gêneros distribuídos na família escolhidas aleatoriamente no banco de dados.

Acesso no GenBank	Espécie	Gênero
NC_008558	<i>Blackberry virus Y*</i>	<i>Brambyvirus</i>
NC_002990	<i>Barley yellow mosaic virus*</i>	<i>Bymovirus</i>
NC_003483	<i>Barley mild mosaic virus</i>	
NC_0040016	<i>Oat mosaic virus</i>	
NC_002350	<i>Wheat yellow mosaic virus</i>	
NC_003797	<i>Sweet potato mild mottle virus*</i>	<i>Ipomovirus</i>
NC_012698	<i>Cassava brown streak virus</i>	
NC_006941	<i>Cucumber vein yellowing virus</i>	
NC_014791	<i>Ugandan cassava brown streak virus</i>	
NC_010521	<i>Squash vein yellowing virus</i>	
NC_018455	<i>Chinese yam necrotic mosaic virus**</i>	<i>Macluravirus</i>
NC_012799	<i>Triticum mosaic virus*</i>	<i>Poacevirus</i>
NC_018572	<i>Caladenia virus A</i>	
NC_014037	<i>Sugarcane streak mosaic virus</i>	
NC_001616	<i>Potato virus Y*</i>	<i>Potyvirus</i>
NC_031339	<i>Euphorbia ringspot virus</i>	

NC_019415	<i>Blue squill virus A</i>	
NC_015394	<i>Hardenbergia mosaic virus</i>	
NC_030336	<i>Impatiens flower break</i>	
NC_016441	<i>Yam bean mosaic virus</i>	
NC_017977	<i>Cyrtanthus elatus virus A</i>	
NC_021197	<i>Donkey orchid virus A</i>	
NC_023175	<i>Zucchini tigre mosaic virus</i>	
NC_017824	<i>Tomato necrotic stunt virus</i>	
NC_010735	<i>Verbena virus Y</i>	
NC_030118	<i>Tobacco mosqueado virus</i>	
NC_020105	<i>Brugmansia mosaic virus</i>	
NC_016044	<i>Chilli ringspot virus</i>	
NC_021786	<i>Habenaria mosaic virus</i>	
NC_026615	<i>Tamarillo leaf malformation virus</i>	
NC_007180	<i>Thunberg fritillary virus</i>	
NC_014252	<i>Panax virus Y</i>	
NC_029051	<i>Jasmine ringspot virus</i>	
NC_030794	<i>Callistephus mottle virus</i>	
NC_030293	<i>Pecan mosaic-associatev virus</i>	
NC_014898	<i>Lupine mosaic virus</i>	
NC_001814	<i>Ryegrass mosaic virus*</i>	<i>Rymovirus</i>
NC_005903	<i>Agropyron mosaic virus</i>	
NC_005904	<i>Hordeum mosaic virus</i>	
NC_001886	<i>Wheat streak mosaic virus*</i>	<i>Tritimovirus</i>
NC_003501	<i>Brome streak mosaic virus</i>	
NC_009805	<i>Wheat eqlid mosaic virus</i>	
NC_005136	<i>Oat necrotic mottle virus</i>	
NC_019031	<i>Rose yellow mosaic virus</i>	Sem gênero

*: Espécies tipo de cada um dos oito gêneros distribuídos na família *Potyviridae*.

** : Não é a espécie tipo do gênero, porém foi escolhida para representá-lo, já que a espécie tipo, *Maclura mosaic virus*, não possui o genoma completo disponível no GenBank.

2.2.8. Detecção dos novos membros da família *Potyviridae* em vetores potenciais por RT-PCR

Foram coletadas cigarrinhas que estavam infestando as amostras de *Stylosanthes guianensis* sintomáticas usadas para sequenciamento via NGS, visando à detecção desses novos vírus nesses insetos, possíveis vetores dos vírus caracterizados. Foi utilizado um

inseto para ser macerado em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol Reagent (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. O cDNA dos novos membros da família *Potyviridae* foram sintetizados e os fragmentos de PCR foram obtidos de acordo com os procedimentos descritos no item 2.2.4. As condições da PCR utilizadas nesta etapa estão descritas na Tabela 2.2.

2.2.9. Caracterização da gama de hospedeiras

Para determinação da gama de hospedeiras desses novos vírus, extratos das folhas de *Stylosanthes guianensis* infectadas por esses vírus de estilosantes foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$), adicionado de sulfito de sódio a 0,01 M (NaSO_3) foi inoculado mecanicamente em 10 espécies de plantas de três famílias botânicas distintas (Tabela 2.6). As plantas foram polvilhadas com carborundum 600 mesh antes da inoculação mecânica e lavadas com água corrente imediatamente após a inoculação. As plantas indicadoras foram mantidas em casa-de-vegetação para observação do desenvolvimento de sintomas após 30 dias da inoculação e a infecção do vírus foi verificada por RT-PCR usando *primers* específicos para identificação da CP dos três novos vírus de estilosantes.



Figura 2.3.: Experimento da gama de hospedeiras. Conduzido em casa de vegetação na Estação Biológica da UnB. Inoculação mecânica em hospedeiras alternativas e potenciais hospedeiras (feijão e soja). Para a inoculação, foi usado como inóculo, extrato vegetal tamponado contendo os três isolados que foram detectados em *Stylosanthes* através do NGS.

Tabela 2.6: Plantas usadas na determinação da gama de hospedeiras. Foram usadas tanto hospedeiras alternativas (algumas espécies das famílias Chenopodiaceae e Solanaceae) quanto potenciais hospedeiras (algumas leguminosas da família Fabaceae). Na tabela encontram-se as famílias botânicas e as devidas espécies utilizadas.

Família	Espécie
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>
Fabaceae	<i>Glicine max</i>
	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>Stylosanthes guianensis</i>
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>
	<i>Nicotiana benthamiana</i>
	<i>Nicotiana glutinosa</i>
	<i>Nicotiana rustica</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>

2.3.RESULTADOS

2.3.1. Purificação viral e extração de RNA total de amostras de *Stylosanthes guianensis*

Após a purificação viral com o objetivo de obter partículas alongadas a partir das amostras infectadas de plantas de *Stylosanthes guianensis*, o extrato viral foi submetido à extração de RNA total. O produto da extração foi visualizado em gel de agarose 1% utilizando TBE com água DEPC para a observação da integridade dos RNAs extraídos (Figura 2.4).

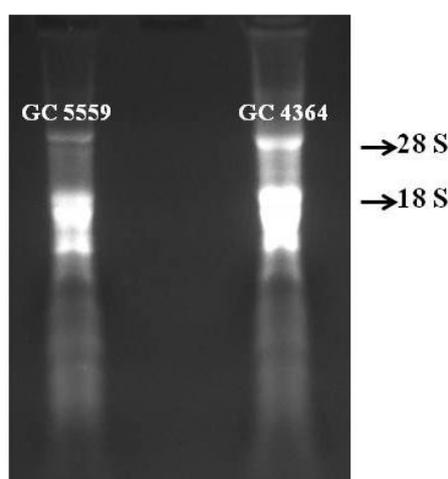


Figura 2.4: Extração de RNA total de amostras de *Stylosanthes guianensis*. Amostras descritas na Tabela 2.1, de *Stylosanthes guianensis* submetidas à purificação parcial de partículas virais alongadas e flexuosas via purificação em colchão de sacarose (30%). Análise em gel de agarose 1%.

2.3.2. Sequenciamento de alto desempenho e análise de bioinformática

As amostras de RNA purificadas foram agrupadas em uma única amostra e sequenciadas na Macrogen INC. (Coréia) usando a tecnologia *Illumina* HiSeq 2000. Obteve-se cerca de 20.299.626 *reads*, que foram analisados e montados usando a ferramenta *de novo* do programa CLC Genomics Workbench 7.0. Com base nos resultados do NGS três novos vírus foram detectados infectando naturalmente amostras de estilosantes com organização genômica similar aos membros da família *Potyviridae*. Estes vírus foram nomeados provisoriamente como: *Stylosanthes mosaic associated virus 1* (StyMaV 1) contendo 9.213 nucleotídeos, *Stylosanthes mosaic associated virus 2* (StyMaV 2) com 9.197 nucleotídeos e *Stylosanthes mosaic associated virus 3* (StyMaV 3) com 9.425 nucleotídeos (tamanhos excluindo a cauda poliA). Os *contigs* montados foram submetidos à análise do programa BLASTX contra o banco de dados viral RefSeq (GenBank) e os *contigs* relacionados com sequências virais de plantas foram selecionados. A análise do genoma foi realizada utilizando o programa Geneious 9.1.

2.3.3. Detecção de *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Stylosanthes mosaic associated virus 3* a partir das regiões 3'-UTR, CP e NIB

Os três vírus detectados via Illumina HiSeq 2000, foram amplificados por RT-PCR a partir de RNA purificado. A reação de RT-PCR foi feita utilizando *primer* oligodT 17 M10 e *primers* específicos para cada vírus que foram sintetizados a partir das sequências consenso obtidas com os dados do NGS. Com isso, foi possível amplificar, fragmentos de tamanho variando de 1,3-1,8 kb (Figura 2.6), correspondendo a parte do gene da proteína NIB, ao gene completo da CP e a região 3'UTR. A Figura 2.5 demonstra as regiões amplificadas dos genomas virais.

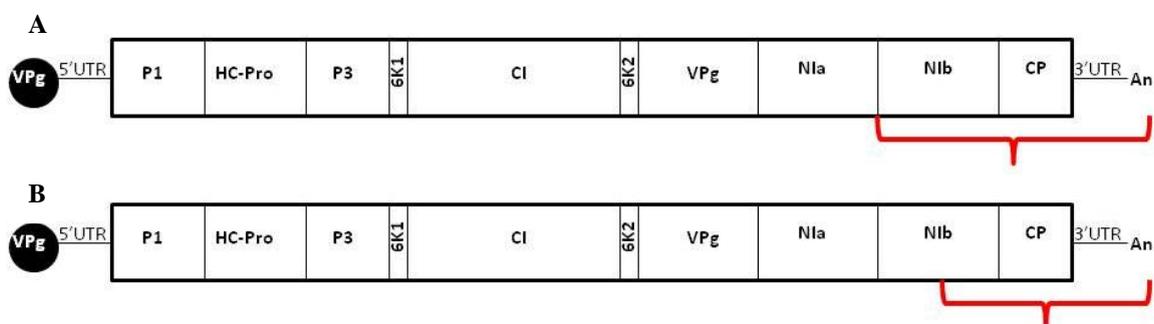


Figura 2.5: Representação esquemática da organização genômica dos vírus encontrados em *Stylosanthes guianensis*. Em vermelho, a região amplificada pelos *primers* M10 e *primers* específicos para StyMaV 1 (A), StyMaV 2 e StyMaV 3 (B) via RT-PCR.

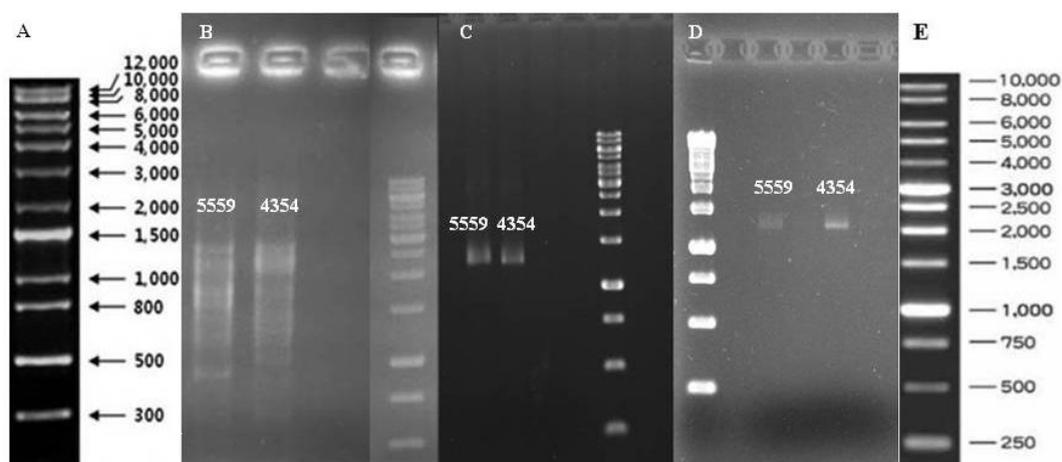


Figura 2.6: Detecção dos novos membros da família *Potyviridae* nas duas amostras de *Stylosanthes guianensis* (GC5559 e GC4364). Amplificação de *Stylosanthes mosaic associated virus 1* na figura B; fragmento de aproximadamente 1,8 kb de acordo com o marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) da figura A. Nas figuras C e D, amplificação de *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*, respectivamente, fragmentos de aproximadamente 1,3 kb, de acordo com o marcador 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen) da figura E.

2.3.4. Clonagem dos fragmentos referentes às regiões 3' UTR, CP e Nib dos vírus *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Stylosanthes mosaic associated virus 3* amplificados por RT-PCR

Os fragmentos amplificados por RT-PCR foram clonados no vetor pGEM-T Easy, sendo possível obter os clones para *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*, porém não para o *Stylosanthes mosaic associated virus 1*. No caso desse vírus (*StyMaV 1*), somente a Nib foi sequenciada, pode ser que a região da CP possui polimorfismo e o *primer* desenhado não amplificou essa região, para isso, será necessário desenhar outro par de *primers* para tentar amplificar essa região. Várias colônias brancas foram obtidas como resultado da transformação por eletroporação. Algumas colônias positivas (brancas) foram escolhidas e isoladas individualmente, as quais, o DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição EcoRI. Após a digestão enzimática pode-se observar que ocorreu a liberação dos fragmentos correspondentes ao DNA clonado (Figura 2.7). Posteriormente, foram selecionados os clones correspondentes às transformações e sequenciados pelo método de Sanger com os primers T7 e SP6 na Macrogen, Coreia.

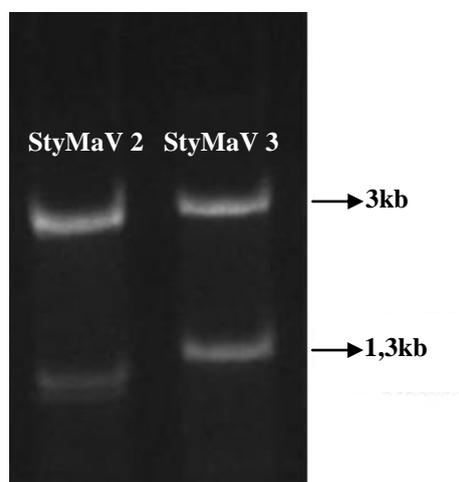


Figura 2.7: Clonagem dos fragmentos genômicos dos vírus *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*. Digestão com endonuclease de restrição EcoRI dos clones de *StyMaV 2* e *StyMaV 3* (respectivamente) originários das plantas GC 5559 e GC 4364. Liberação dos fragmentos de 1,3 kb clonado no vetor pGEM-T Easy de 3 kb.

As sequências dos clones foram analisadas, e uma sequência consenso foi gerada a partir dos quatro clones selecionados e sequenciados. A sequência do inserto do *StyMaV 2* continha 1.305 nucleotídeos, apresentando uma única ORF a partir da posição 1 até a 1.305, e seguido pela região 3' não traduzida (3' UTR) com tamanho de 77 nucleotídeos e uma cauda poliA. A sequência de nucleotídeos foi utilizada para a dedução da sequência de aminoácidos, que resultou em uma poliproteína contendo 427 resíduos de aminoácidos (aa). A sequência de nucleotídeos da CP apresentou 42% de identidade e de aminoácido

41% de identidade com o *Blackberry virus Y* (NC_008558). A sequência do inserto do StyMaV 3 continha 1.303 nucleotídeos, apresentando uma única ORF a partir da posição 1 até 1.303, e seguido pela região 3' não traduzida (3' UTR) com tamanho de 59 nucleotídeos e uma cauda poliA. A sequência de nucleotídeos foi utilizada para a dedução da sequência de aminoácidos, que resultou em uma poliproteína contendo 329 resíduos de aminoácidos (aa). A sequência de nucleotídeos da CP apresentou 47% de identidade e de aminoácidos 58% de identidade com o *Rose yellow mosaic virus* (NC_019031). Não foi possível o sequenciamento dessas regiões para o *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, no entanto, a região sequenciada equivalente à proteína N1b, apresentou 36% de identidade em sua sequência de aminoácidos e nucleotídeos com o *Blackberry virus Y* (NC_008558).

2.3.5. Isolamento e sequenciamento da região 5' dos genomas dos vírus de estilosantes via a técnica de 5' RACE (*Rapid Amplification DNAs End*)

Para o isolamento da região 5' UTR do genoma dos isolados de estilosantes, *primers* antisense foram sintetizados para a confirmação das extremidades 5' dos genomas virais. Pela técnica de 5' RACE, foi possível amplificar três fragmentos com tamanhos variáveis de 350 pb, 400 pb e 600 pb aproximadamente em StyMaV 1 e de 250 pb, 300 pb e 400 pb aproximadamente em StyMaV 3. Os fragmentos de aproximadamente 350 pb e 250 pb correspondentes aos vírus StyMaV 1 e StyMaV 3, respectivamente, foram selecionados, clonados e enviados para sequenciamento. No caso do StyMaV 2, a amplificação da região 5' UTR ainda não foi possível. Os referidos fragmentos podem ser visualizados na Figura 2.8.

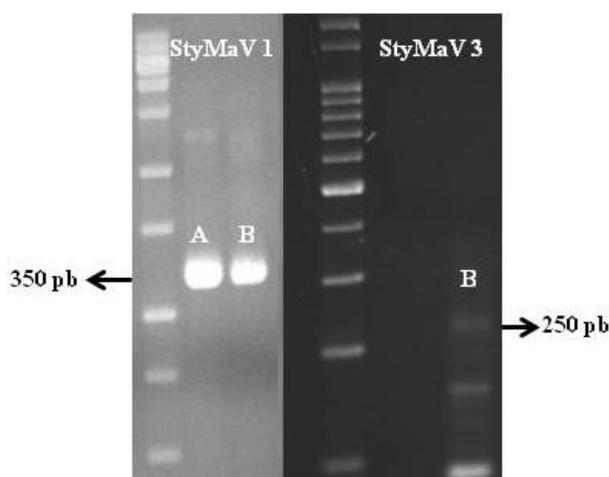


Figura 2.8: Fragmentos amplificados da região 5' UTR via a técnica de 5' RACE dos vírus StyMaV 1 e StyMaV 3. Amplificação dessa região nas duas amostras de *Stylosanthes guianensis*, GC 5559 (A) e GC 4364 (B) usadas no sequenciamento de alto desempenho. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1.5% e o marcador usado foi de 100pb.

2.3.6. Análise filogenética utilizando sequências completas de nucleotídeos e aminoácidos da poliproteína de StyMaV 1, StyMaV 2 e StyMaV 3 com as espécies tipo dos gêneros da família *Potyviridae*

As sequências nucleotídicas completas obtidas via NGS, foram analisadas e editadas utilizando-se o programa Geneious 9.1. Foram alinhadas com sequências de outros vírus da família *Potyviridae* disponíveis no banco de dados do GenBank (Tabela 2.5) utilizando o programa MAFFT v. 7. 222 e as árvores filogenéticas foram construídas utilizando o programa Fast Tree. As análises filogenéticas para a poliproteína, tanto da sequência de nucleotídeo (Figura 2.9) quanto da de aminoácidos (Figura 2.10) revelaram que *Stylosanthes mosaic associated virus 1* e *Stylosanthes mosaic associated virus 2* representam duas novas espécies dentro de um novo gênero da família *Potyviridae*. *Stylosanthes mosaic associated virus 3* também é uma nova espécie que também pode ser classificado em um novo gênero dentro da família, distinto daquele formado por StyMaV 1 e StyMaV 2.

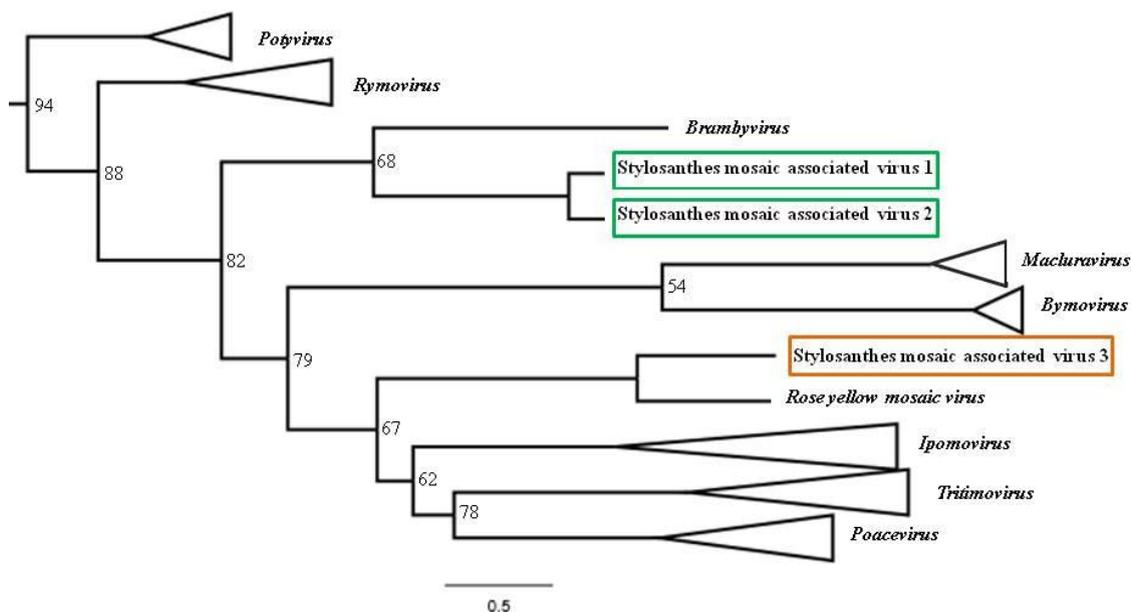


Figura 2.9: Árvore filogenética utilizando a sequência nucleotídica da poliproteína das espécies tipo de cada um dos gêneros da família *Potyviridae* e os novos vírus de *Stylosanthes guianensis*. Em verde os dois novos vírus StyMaV 1 e StyMaV 2 mais relacionados ao *Blackberry virus Y*, pertencente ao gênero *Brambyvirus*. Em laranja, o StyMaV 3 que representa uma nova espécie mais relacionada ao *Rose yellow mosaic virus* sem gênero definido. As sequências foram alinhadas através do *software* MAFFT e a árvore utilizando o programa Fast Tree. Valores de bootstrap em porcentagem, considerando apenas aqueles acima de 50%.

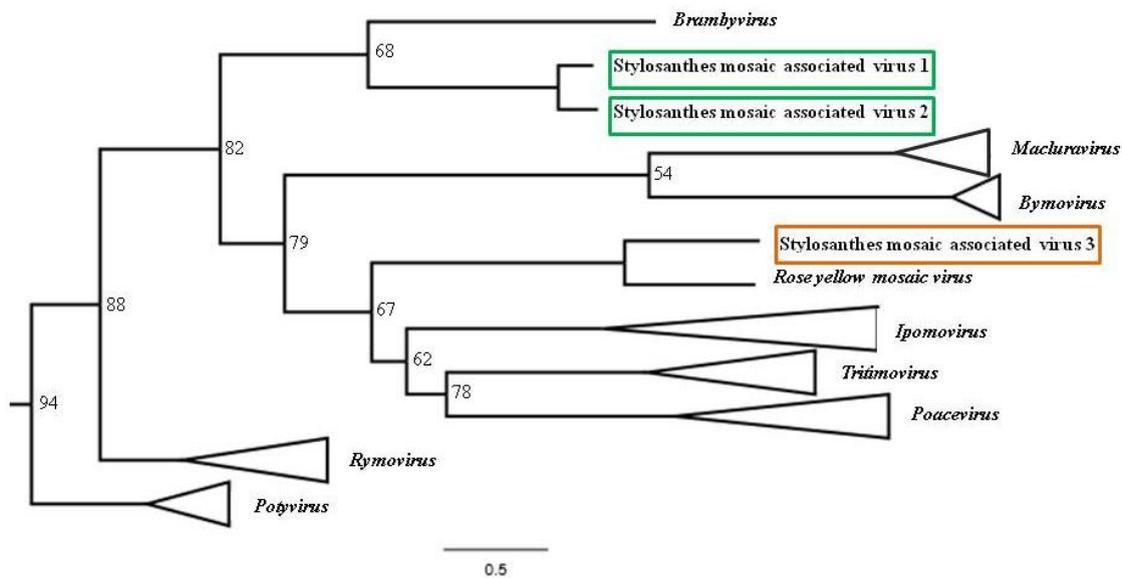


Figura 2.10: Árvore filogenética utilizando a sequência de aminoácidos da poliproteína das espécies tipo de cada um dos gêneros dentro da família *Potyviridae* e os novos vírus de *Stylosanthes guianensis*. Em verde os dois novos vírus StyMaV 1 e StyMaV 2 mais relacionados ao *Blackberry virus Y*, pertencente ao gênero *Brambyvirus*. Em laranja, o StyMaV 3 que representa uma nova espécie mais relacionada ao *Rose yellow mosaic virus* sem gênero definido. As sequências foram alinhadas através do *software* MAFFT e a árvore utilizando o programa Fast Tree. Valores de bootstrap em porcentagem, considerando apenas aqueles acima de 50%.

2.3.7. Análises comparativas de identidade genética utilizando sequências de nucleotídeos e aminoácidos das proteínas funcionais de StyMaV 1, StyMaV 2 e StyMaV 3 com as espécies tipo dos gêneros da família *Potyviridae*.

A análise do genoma viral após o sequenciamento (NGS) dos três isolados dos novos membros da família *Potyviridae*, revelou que estes codificam uma poliproteína, denominada ORF 1 (Open reading frame), com 3.020 resíduos de aminoácidos (aa) e massa molecular de 332,38 kDa (StyMaV 1), 2.958 resíduos de aa e massa molecular de 336,06 kDa (StyMaV 2) e 3.065 resíduos de aa e massa molecular de 325,32 kDa (StyMaV 3), todos iniciando no códon de iniciação AUG nas posições 180 (StyMaV 1), 173 (StyMaV 2) e 164 (StyMaV 2), e terminando no códon de parada UAA nas posições 9062 (StyMaV 1), 9049 (StyMaV 2) e 9267 (StyMaV 3). A pequena ORF 2, codifica a proteína P3N+PIPO que se encontra incorporada no cístron da P3. A poliproteína codifica 10 proteínas multifuncionais, sendo elas P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-pro, NIb e CP. Possui nove sítios de clivagem e três proteínases que são P1-Proteínase (P1/HC-Pro), HC-Proteínase (HC-Pro/P3) e NIa-Proteínase (P3/6K1, 6K1/CI, CI/6K2, 6K2/VPg, NIa-Pro/NIb e NIb/CP). A organização genômica com a ordenação dos genes, assim como, os sítios de clivagem das proteínas funcionais podem ser visualizados na Figura 2.11 e Tabela 2.7, respectivamente.

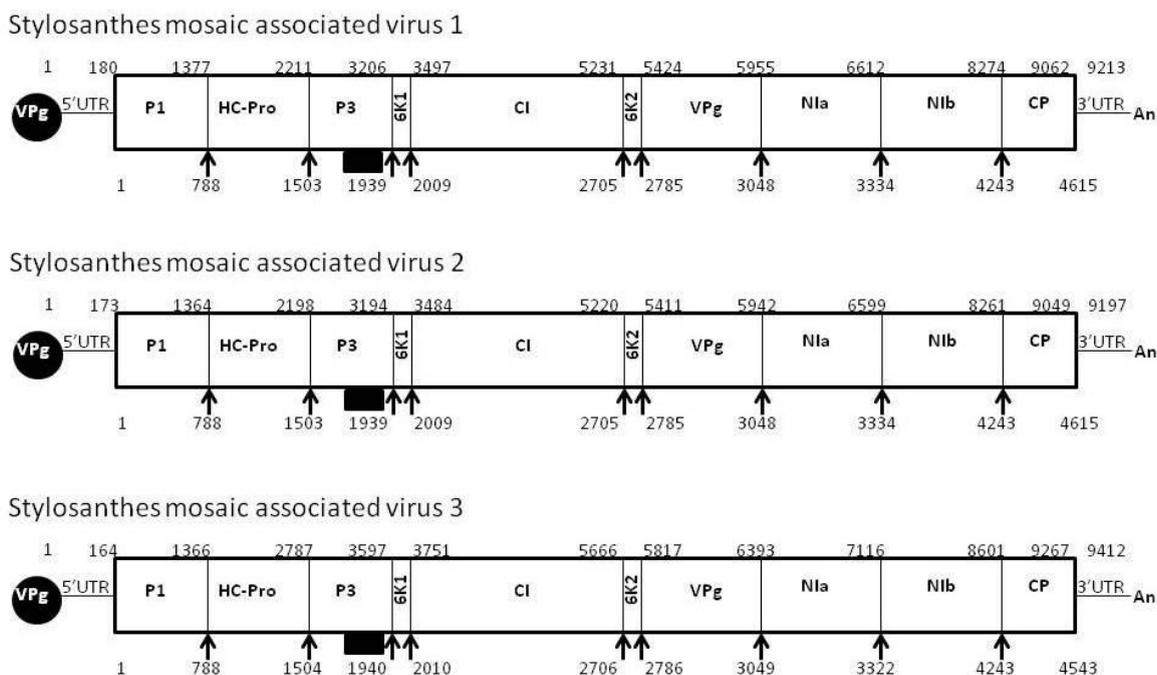


Figura 2.11: Mapa genômico dos novos vírus encontrados nas amostras de *Stylosanthes guianensis*. Representação esquemática das dez proteínas funcionais presentes nesses vírus. Números acima indicam a posição de nucleotídeos. Números na parte inferior indicam a posição dos aminoácidos. Os sítios de clivagem estão indicados abaixo com setas pretas. O círculo preto rotulado como VPg representa a proteína ligada à região 5' UTR e uma cauda poliA ligada à região 3' UTR. O retângulo preto embaixo da proteína P3 representa a proteína PIPO.

Tabela 2.7: Sítios de clivagem dos três novos vírus da família *Potyviridae* encontrados em *Stylosanthes guianensis*. Sítios correspondentes às proteínas dos três novos vírus caracterizados.

Sítios de Clivagem	StyMaV 1	StyMaV 2	StyMaV 3
P1/HC-Pro	IDFY ₇₈₈ /S ₇₈₉	VQFY ₇₈₈ /S ₇₈₉	LFYC ₇₈₈ /S ₇₈₉
HC-Pro/P3	YTVG ₁₅₀₃ /G ₁₅₀₄	YTVG ₁₅₀₃ /G ₁₅₀₄	YRAG ₁₅₀₄ /G ₁₅₀₅
P3/6K1	VKFE ₁₉₃₉ /A ₁₉₄₀	VKFE ₁₉₃₉ /A ₁₉₄₀	VVYE ₁₉₄₀ /S ₁₉₄₁
6K1/CI	IQFQ ₂₀₀₉ /S ₂₀₁₀	IQFQ ₂₀₀₉ /S ₂₀₁₀	XXDE ₂₀₁₀ /V ₂₀₁₁
CI/6K2	IKFQ ₂₇₀₅ /G ₂₇₀₆	IKFQ ₂₇₀₅ /G ₂₇₀₆	VLFE ₂₇₀₆ /G ₂₇₀₇
6K2/VPg	ISFE ₂₇₈₅ /G ₂₇₈₆	VVFE ₂₇₈₅ /G ₂₇₈₆	VAYE ₂₇₈₆ /G ₂₇₈₇
VPg/NIa	FEFE ₃₀₄₈ /G ₃₀₄₉	FEFE ₃₀₄₈ /G ₃₀₄₉	VRFE ₃₀₄₉ /S ₃₀₅₀
NIa/NIb	VXXQ ₃₃₃₄ /G ₃₃₃₅	VXXQ ₃₃₃₄ /G ₃₃₃₅	VSQY ₃₃₃₂ /G ₃₃₂₃
NIb/CP	ITFQ ₄₂₄₃ /G ₄₂₄₄	ITFQ ₄₂₄₃ /S ₄₂₄₄	KETV ₄₂₄₃ /A ₄₂₄₄

As análises comparativas entre as sequências nucleotídicas da poliproteína de StyMaV 1, StyMaV 2 e StyMaV 3 com sequências de outros vírus disponíveis no banco de dados (GenBank), revelaram que dois dos três vírus em estudo, *Stylosanthes mosaic associated virus 1* e *Stylosanthes mosaic associated virus 2*, apresentaram maior identidade

nucleotídica com *Blackberry virus Y* (BVY) (NC_008558). O outro vírus, *Stylosanthes mosaic associated virus 3*, apresentou maior identidade nucleotídica com o *Rose yellow mosaic virus* (RoYMV). A identidade de aminoácido da CP de StyMaV 1 e StyMaV 2 é de 40% (Tabela 2.9) e 41% (Tabela 2.11) com relação ao BVY e de 72% entre eles. Para o StyMaV 3 é de 59% com relação ao RoYMV, 26% com relação ao StyMaV 1 e 29% com relação ao StyMaV 2 (Tabela 2.13). Quanto a identidade de nucleotídeos da CP, os resultados foram mais variáveis, StyMaV 1 apresentou 43% (Tabela 2.8) com relação aos vírus ChYNMV (*Macluravirus*), WSMV (*Tritimovirus*) e BaYMV (*Bymovirus*). O StyMaV 2 apresentou 44% com relação ao RgMV (*Rymovirus*) e 72% com relação ao StyMaV 1 (Tabela 2.10). Já o StyMaV 3 apresentou 47% com relação ao RoYMV, 52% com relação ao StyMaV 1 e 48% com relação ao StyMaV 2 (Tabela 2.12).

Tabela 2.8: Porcentagem de identidade de nucleotídeo (nt) de *Stylosanthes mosaic associated virus 1* (StyMaV 1). Porcentagem entre as proteínas funcionais de StyMaV 1 e das espécies tipo de cada um dos gêneros da família *Potyviridae*.

Vírus*	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
ChYNMV	-	40	38	-	38	-	43	37	39	43
WSMV	42	38	35	30	37	28	42	40	40	43
RgMV	36	42	36	36	38	38	41	38	39	41
TriMV	40	38	37	23	34	37	44	-	42	39
PVY	42	55	34	37	35	35	41	35	38	41
SPMMV	44	37	38	28	35	37	40	41	38	38
BaYMV	-	-	36	22	35	39	41	37	37	43
BVY	44	35	36	38	38	33	45	39	41	39
StyMaV 2	54	77	74	73	75	73	80	72	73	72
RoYMV	43	36	37	-	39	38	42	38	38	39
StyMaV 3	51	53	51	46	52	51	50	55	54	52

(*) Membros da família *Potyviridae* cujas sequências foram comparadas: *Chinese yam necrotic mosaic virus* (NC_018455), *Wheat streak mosaic virus* (NC_018866), *Ryegrass mosaic virus* (NC_001814), *Triticum mosaic virus* (NC_012799), *Potato virus Y* (NC_001616), *Sweet potato mild mottle virus* (NC_003797), *Barley yellow mosaic virus* (NC_002990), *Blackberry virus Y* (NC_08558), *Stylosanthes mosaic associated virus 2*, *Rose yellow mosaic virus* (NC_019031) e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*.

(-) Proteínas ausentes nesses vírus.

Tabela 2.9: Porcentagem de identidade de aminoácidos (aa) de *Stylosanthes mosaic associated virus 1* (StyMaV 1). Porcentagem entre as proteínas funcionais de StyMaV 1 e das espécies tipo de cada um dos gêneros da família *Potyviridae*.

Vírus*	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
ChYNMV	-	25	20	-	31	-	24	25	34	29
WSMV	24	24	17	23	28	25	31	28	41	29
RgMV	26	32	23	31	36	21	31	26	44	37
TriMV	27	27	23	20	27	41	27	-	42	26
PVY	22	27	18	22	35	31	31	24	43	37
SPMMV	27	22	21	27	29	27	34	27	41	28
BaYMV	-	-	27	22	29	22	32	25	37	26
BVY	25	25	20	42	44	32	41	31	53	40
StyMaV2	46	83	76	85	84	70	92	82	82	72
RoYMV	27	28	20	-	30	20	28	30	43	27
StyMaV3	24	23	20	25	30	36	32	26	41	26

(*) Membros da família *Potyviridae* cujas sequências foram comparadas: *Chinese yam necrotic mosaic virus* (NC_018455), *Wheat streak mosaic virus* (NC_018866), *Ryegrass mosaic virus* (NC_001814), *Triticum mosaic virus* (NC_012799), *Potato virus Y* (NC_001616), *Sweet potato mild mottle virus* (NC_003797), *Barley yellow mosaic virus* (NC_002990), *Blackberry virus Y* (NC_08558), *Stylosanthes mosaic associated virus 2*, *Rose yellow mosaic virus* (NC_019031) e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*.

(-) Proteínas ausentes nesses vírus.

Tabela 2.10: Porcentagem de identidade de nucleotídeo (nt) de *Stylosanthes mosaic associated virus 2* (StyMaV 2). Porcentagem entre as proteínas funcionais de StyMaV 2 e das espécies tipo de cada um dos gêneros da família *Potyviridae*.

Vírus*	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
ChYNMV	-	38	38	-	38	-	41	37	30	42
WSMV	42	39	36	23	39	33	43	40	40	41
RgMV	42	38	38	29	37	37	40	37	39	44
TriMV	37	37	36	31	35	35	38	-	42	36
PVY	37	55	33	30	37	35	40	38	37	40
SPMMV	44	38	37	34	35	42	41	36	39	37
BaYMV	-	-	35	23	36	39	41	36	39	40
BVY	42	34	35	37	38	33	46	37	40	42
StyMaV1	54	77	74	73	75	73	80	72	73	72
RoYMV	40	39	32	-	36	34	38	35	38	39
StyMaV3	53	53	55	45	52	58	54	52	55	48

(*) Membros da família *Potyviridae* cujas sequências foram comparadas: *Chinese yam necrotic mosaic virus* (NC_018455), *Wheat streak mosaic virus* (NC_018866), *Ryegrass mosaic virus* (NC_001814), *Triticum mosaic virus* (NC_012799), *Potato virus Y* (NC_001616), *Sweet potato mild mottle virus* (NC_003797), *Barley yellow mosaic virus* (NC_002990), *Blackberry virus Y* (NC_08558), *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, *Rose yellow mosaic virus* (NC_019031) e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*.

(-) Proteínas ausentes nesses vírus.

Tabela 2.11: Porcentagem de identidade de aminoácidos (aa) de Stylosanthes mosaic associated virus 2 (StyMaV 2). Porcentagem entre as proteínas funcionais de StyMaV 2 e das espécies tipo de cada um dos gêneros da família *Potyviridae*.

Vírus*	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
ChYNMV	-	25	22	-	30	-	24	24	36	28
WSMV	25	29	16	19	28	30	31	27	41	28
RgMV	27	29	26	27	36	32	29	25	44	37
TriMV	21	28	22	18	27	40	27	-	42	25
PVY	22	27	18	26	35	29	34	24	43	35
SPMMV	24	26	18	26	29	27	34	27	40	24
BaYMV	-	-	23	23	30	43	30	25	36	28
BVY	22	29	23	42	44	24	43	33	52	41
StyMaV1	46	83	76	85	84	70	92	82	82	72
RoYMV	30	26	19	-	30	38	29	32	42	26
StyMaV3	27	24	22	19	31	32	33	27	43	29

(*) Membros da família *Potyviridae* cujas sequências foram comparadas: *Chinese yam necrotic mosaic virus* (NC_018455), *Wheat streak mosaic virus* (NC_018866), *Ryegrass mosaic virus* (NC_001814), *Triticum mosaic virus* (NC_012799), *Potato virus Y* (NC_001616), *Sweet potato mild mottle virus* (NC_003797), *Barley yellow mosaic virus* (NC_002990), *Blackberry virus Y* (NC_08558), *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, *Rose yellow mosaic virus* (NC_019031) e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*.

(-) Proteínas ausentes nesses vírus.

Tabela 2.12: Porcentagem de identidade de nucleotídeo (nt) de *Stylosanthes mosaic associated virus 3* (StyMaV 3). Porcentagem entre as proteínas funcionais de StyMaV 3 e das espécies tipo de cada um dos gêneros da família *Potyviridae*.

Vírus*	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
ChYNMV	-	40	35	-	37	-	38	32	37	42
WSMV	38	37	40	35	37	34	39	36	36	44
RgMV	43	37	35	34	38	33	40	35	38	39
TriMV	37	32	35	32	36	40	39	-	43	38
PVY	38	51	35	31	37	44	40	32	38	44
SPMMV	38	34	36	36	36	47	36	34	39	37
BaYMV	-	-	35	22	37	37	39	39	36	42
BVY	40	40	35	45	37	35	42	36	38	41
StyMaV1	51	53	51	46	52	51	50	55	54	52
StyMaV2	34	54	55	45	52	58	54	52	55	48
RoTMV	39	38	33	-	44	37	44	39	42	47

(*) Membros da família *Potyviridae* cujas sequências foram comparadas: *Chinese yam necrotic mosaic virus* (NC_018455), *Wheat streak mosaic virus* (NC_018866), *Ryegrass mosaic virus* (NC_001814), *Triticum mosaic virus* (NC_012799), *Potato virus Y* (NC_001616), *Sweet potato mild mottle virus* (NC_003797), *Barley yellow mosaic virus* (NC_002990), *Blackberry virus Y* (NC_08558), *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Rose yellow mosaic virus* (NC_019031).

(-) Proteínas ausentes nesses vírus.

Tabela 2.13: Porcentagem de identidade de aminoácido (aa) de *Stylosanthes mosaic associated virus 3* (StyMaV 3). Porcentagem entre as proteínas funcionais de StyMaV 3 e das espécies tipo de cada um dos gêneros da família *Potyviridae*.

Vírus*	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
ChYNMV	-	25	24	-	25	-	28	21	35	26
WSMV	27	22	25	32	35	22	29	30	41	23
RgMV	26	23	19	19	35	20	31	29	39	30
TriMV	27	21	22	19	28	14	31	-	43	25
PVY	22	25	18	27	36	12	29	26	39	29
SPMMV	27	25	24	25	31	12	28	26	43	26
BaYMV	-	-	19	26	25	27	22	22	32	29
BVY	31	22	23	23	30	21	34	26	38	25
StyMaV1	24	23	20	25	30	36	32	26	41	26
StyMaV2	27	24	22	19	31	32	33	27	43	29
RoYMV	38	38	31	-	61	44	56	51	60	59

(*) Membros da família *Potyviridae* cujas sequências foram comparadas: *Chinese yam necrotic mosaic virus* (NC_018455), *Wheat streak mosaic virus* (NC_018866), *Ryegrass mosaic virus* (NC_001814), *Triticum mosaic virus* (NC_012799), *Potato virus Y* (NC_001616), *Sweet potato mild mottle virus* (NC_003797), *Barley yellow mosaic virus* (NC_002990), *Blackberry virus Y* (NC_08558), *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Rose yellow mosaic virus* (NC_019031).

(-) Proteínas ausentes nesses vírus.

As figuras 2.12 e 2.13 mostram a matriz de identidade de comparação das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente, das proteínas CI, CP, HC-Pro e Nib, incluindo sequências dessas mesmas proteínas de espécies tipo de cada gênero dentro da família. Esta matriz demonstra que os novos vírus de estilosantes possuem baixíssima identidade quando comparados com os demais vírus. Já no caso de StyMaV 1 com StyMaV 2, pode-se notar que ambos possuem uma identidade que varia de 68% a 74%, mostrando assim, que são duas novas espécies dentro de um provável novo gênero na família *Potyviridae*.

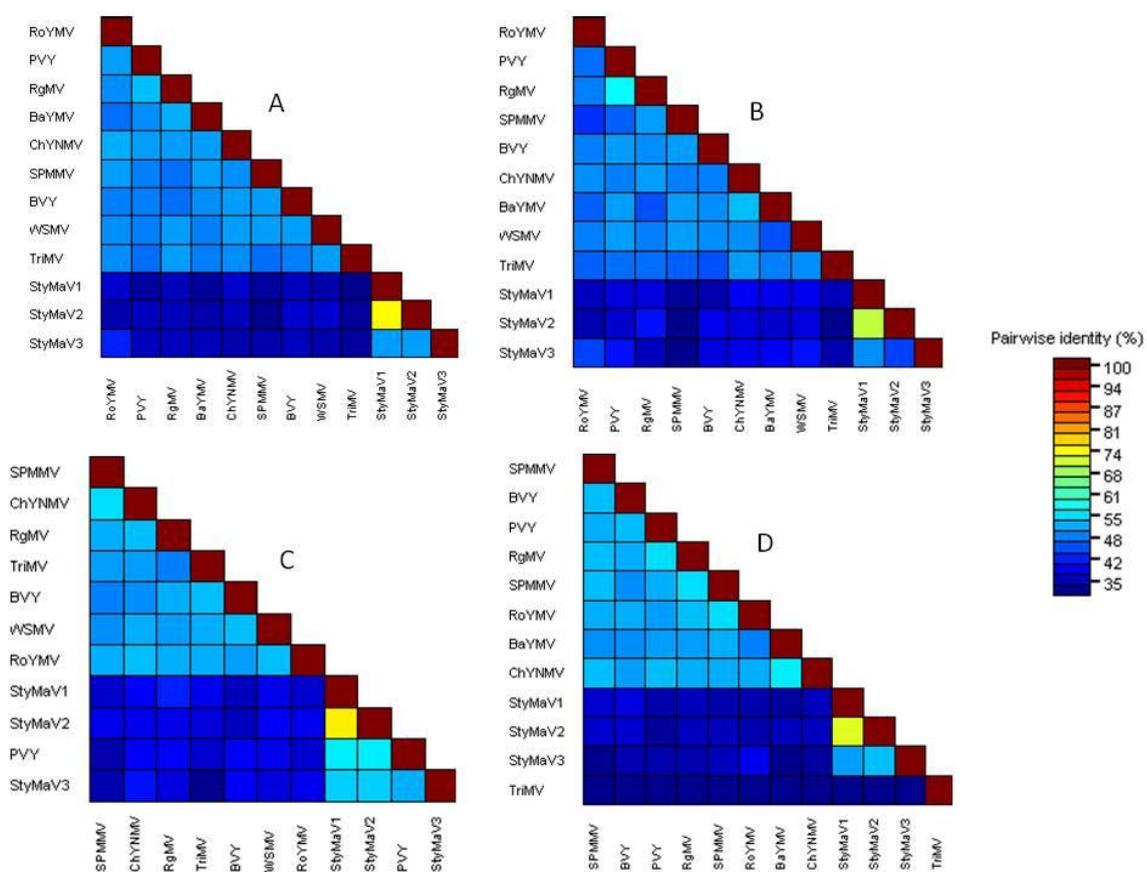


Figura 2.12: Matriz de comparação das sequências de nt das proteínas das espécies tipo de cada um dos gêneros dentro da família *Potyviridae* dos vírus de *Stylosanthes guianensis*. Letra “A” proteínas de inclusões citoplasmáticas (CI), letra “B” capa protéica (CP), letra “C” helper component- proteinase (HC-Pro) e letra “D” inclusões nucleares b (Nib). O valor do grau de identidade entre as sequências é dado em porcentagem. *Sweet potato mild mottle virus* (SPmMV), *Blackberry virus Y* (BVY), *Potato virus Y* (PVY), *Ryegrass mosaic virus* (RgMV), *Rose yellow mosaic virus* (RoYmV), *Barley yellow mosaic virus* (BaYmV), *Chinese yam necrotic mosaic virus* (ChYnMV), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), *Triticum mosaic virus* (TriMV), *Stylosanthes mosaic associated virus 1* (StyMaV 1), *Stylosanthes mosaic associated virus 2* (StyMaV 2) e *Stylosanthes mosaic associated virus 3* (StyMaV 3)

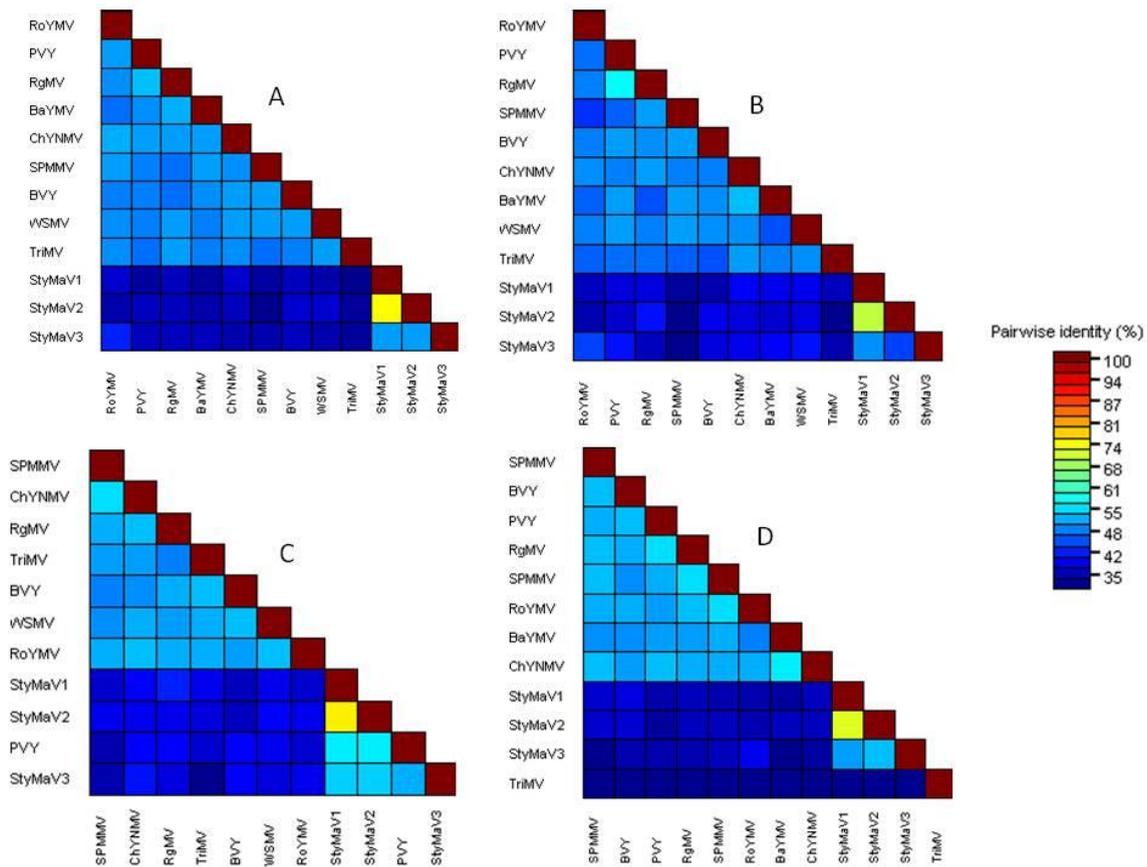


Figura 2.13: Matriz de comparação das seqüências de aa das proteínas das espécies tipo de cada um dos gêneros dentro da família *Potyiridae* e os vírus de *Stylosanthes guianensis*. Letra “A” proteínas de inclusões citoplasmáticas (CI), letra “B” capa protéica (CP), letra “C” helper component- proteinase (HC-Pro) e letra “D” inclusões nucleares b (NIb). O valor do grau de identidade entre as seqüências é dado em porcentagem. *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), *Blackberry virus Y* (BVY), *Potato virus Y* (PVY), *Ryegrass mosaic virus* (RgMV), *Rose yellow mosaic virus* (RoYMV), *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV), *Chinese yam necrotic mosaic virus* (ChYNMV), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), *Triticum mosaic virus* (TriMV), *Stylosanthes mosaic associated virus 1* (StyMaV 1), *Stylosanthes mosaic associated virus 2* (StyMaV 2) e *Stylosanthes mosaic associated virus 3* (StyMaV 3).

2.3.8 Detecção em vetor potencial dos novos vírus encontrados em *Stylosanthes guianensis*

Cigarrinhas que estavam infestando as amostras de *Stylosanthes guianensis* sintomáticas usadas para sequenciamento via NGS, foram coletadas visando à detecção desses vírus de estíloantes nesses insetos, como prováveis vetores desse vírus, somente para um estudo preliminar. Um inseto foi escolhido aleatoriamente, extraiu-se o RNA total e a detecção por RT-PCR foi feita para os três vírus de estíloantes utilizando *primer* oligodT 17 M10 e *primers* específicos que foram desenhados a partir das seqüências consenso obtidas no sequenciamento via NGS. Com isso, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 1,8 kb (Figura 2.14), provavelmente corresponde ao *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, porém, não foi confirmado por sequenciamento. Para os outros dois vírus StyMaV 2 e StyMaV 3 fragmentos virais não foram detectados.

2.3.9 Caracterização da gama de hospedeiras

Obteve-se um extrato das folhas de *Stylosanthes guianensis* infectadas, com os três novos vírus, em tampão fosfato de sódio pH neutro foi feito. Posteriormente, inoculou-se mecanicamente em 10 espécies de plantas de três famílias botânicas distintas (Tabela 2.6). As plantas indicadoras foram mantidas em casa-de-vegetação para observação do desenvolvimento de sintomas durante 30 dias. A infecção do vírus foi verificada 15 dias após a inoculação por RT-PCR usando *primers* específicos para identificação da CP dos potyvirus de estilosantes. Das plantas que foram inoculadas apenas *Nicotiana benthamiana* e *Phaseolus vulgaris* apresentaram sintomas de infecção viral como pode ser visto na Figura 2.15. A comprovação da infecção foi realizada via a detecção por RT-PCR que foi feita para os três novos membros da família *Potyviridae*, utilizando *primer* oligodT 17M10 e *primers* específicos para cada um deles. Com isso, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 1,3 kb em *Nicotiana benthamiana* correspondente ao Stylosanthes mosaic associated virus 2 e um fragmento de aproximadamente 1,3 kb em *Phaseolus vulgaris* correspondente ao Stylosanthes mosaic associated virus 3 (Figura 2.16), Stylosanthes mosaic associated virus 1, não foi detectado em nenhuma das amostras vegetais inoculadas. Os fragmentos amplificados foram confirmados por sequenciamento.



Figura 2.14: Plantas sintomáticas. *Nicotiana benthamiana* (A) apresentando sintomas de mosqueado e deformação foliar; e *Phaseolus vulgaris* (B) apresentando sintomas de mosaico severo após inoculação mecânica com extrato vegetal na presença de tampão neutro contendo os três isolados. Os sintomas foram observados aos 7 dpi, 15 dpi e 30 dpi e foram coletadas amostras sintomáticas para análise da presença dos três vírus.

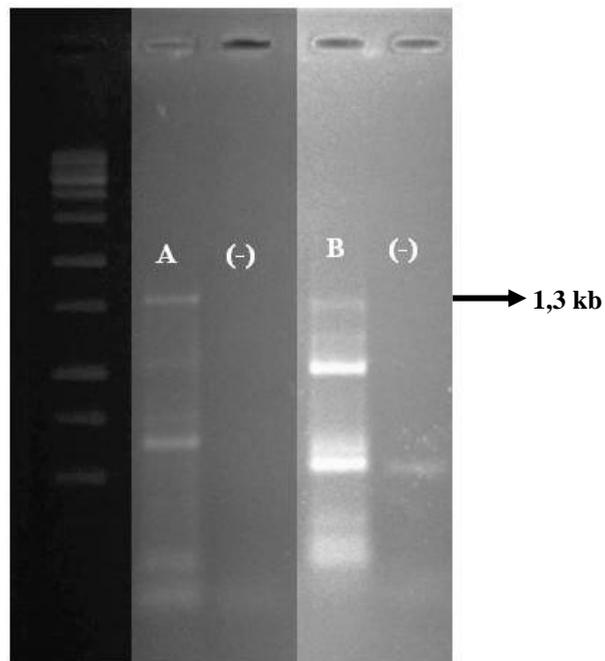


Figura 2.15: Detecção dos novos membros da família *Potyviridae* em *Nicotiana benthamiana* (A) e *Phaseolus vulgaris* (B). Visualização dos fragmentos de PCR em gel de agarose 1%. Em *Nicotiana benthamiana* foi possível detectar o Stylosanthes mosaic associated virus 2, já em *Phaseolus vulgaris*, foi possível detectar o Stylosanthes mosaic associated virus 3.

2.4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem-se notado uma alta incidência de sintomas típicos de vírus, como mosaico, amarelecimento e nanismo, em gramíneas e leguminosas forrageiras, presentes em áreas experimentais da Embrapa Gado de Corte em Mato Grosso do Sul, como também em áreas de produção de sementes de forrageiras. Apesar desse emergente problema e que está se expandindo, pouco é conhecido a respeito de infecções causadas por agentes etiológicos virais em plantas forrageiras no Brasil. Tal limitação demonstra a importância do presente trabalho. A partir de dois acessos de *Stylosanthes guianensis*, com sintomas de mosaico, coletados na Embrapa Gado de Corte, em Mato Grosso do Sul, foi realizado um sequenciamento de alto desempenho (NGS), que resultou na descoberta de três novos vírus, membros da família *Potyviridae*, com base na análise da sequência do genoma em estudo, e no critério de demarcação de espécie descrito por Adams *et al.* (2005b). Com esse resultado foi realizada a primeira caracterização de vírus em estilosantes no Brasil e no mundo, nomeados provisoriamente: Stylosanthes mosaic associated virus 1 (StyMaV 1), Stylosanthes mosaic associated virus 2 (StyMaV 2) e Stylosanthes mosaic associated virus 3 (StyMaV 3). A família *Potyviridae* representa um dos grupos de vírus mais importantes por atingirem uma ampla gama de hospedeiras e causar diversas doenças em plantas de interesse econômico. O fato dos membros da família *Potyviridae* serem altamente disseminados se deve, provavelmente, à variedade de vetores e a ativa migração deles. Considerando que dependendo do gênero dentro da família a transmissão pode ser por fungos, mosca branca, espécies de afídeos e ácaros e até por sementes. A disseminação viral é agravada, tornando ainda mais difícil o controle e prevenção de infecções causadas por esses vírus na agricultura (Ivanov *et al.*, 2014; Gibbs *et al.*, 2008).

2.4.1. Caracterização molecular de StyMaV 1, StyMaV 2 e StyMaV 3

No sequenciamento de alto desempenho (NGS) foi detectado três sequências genômicas completas de vírus infectando estilosantes em condições de campo. Esses resultados mostraram que os genomas apresentam RNA com tamanho de 9.213 nt para o vírus o StyMaV 1, 9.197 nt para o StyMaV2 e 9.412 nt para o StyMaV 3, excluindo a cauda poliA. Foram identificadas as ORFs codificadoras de uma poliproteína de 4.615 aminoácidos (aa) para StyMaV 1 e StyMaV 2, e de 4.543 aa para o StyMaV 3. Através das análises feitas nas sequências das poliproteínas dos três vírus, foi possível não só deduzir os resíduos de aminoácidos presentes em cada sítio de clivagem, como também identificar os motivos conservados nas sequências de cada proteína viral.

A proteína P1 é a primeira proteína madura de todos os membros da família *Potyviridae*, além de ser uma protease com clivagem em *cis*, sendo responsável pela

clivagem P1/HC-Pro, é menos conservada, exceto a região C-terminal que possui resíduos e motivos que desempenham funções na atividade proteolítica de serina protease, isso faz com que essa região seja mais conservada (Adams *et al.*, 2005b). Este fato foi observado na comparação dos três novos vírus de estilosantes, apresentando a menor porcentagem de identidade nucleotídica em relação às demais proteínas quando comparada com as espécies tipo de cada um dos gêneros dentro da família, que variaram de 36% a 44% para StyMaV 1 e StyMaV 2, e de 37% a 55% para o vírus StyMaV 3. Foi identificada nas sequências de StyMaV 1, StyMaV 2 e StyMaV 3 apresentando os sítios de clivagem IDFY/S VQFY/S e LFYC/S, respectivamente (Tabela 2.7).

A proteína HC-Pro é bastante estudada, pois além de ser uma protease que também possui sua atividade em *cis*, é uma proteína multifuncional que desempenha o papel de supressora do silenciamento gênico e também é responsável pela transmissão por afídeos (Maia *et al.*, 1996; Anandalakshmi *et al.*, 1998). É responsável pela clivagem HC-Pro/P3 que ocorre entre os resíduos de glicina (G/G), sendo este, o mais conservado entre todos os sítios de clivagem da família *Potyviridae* (Adams *et al.*, 2005b). Os resíduos de tirosina (Y), valina (V) e glicina (G), foram encontrados nos vírus StyMaV 1 e StyMaV 2 (YTVG/G) e apenas os resíduos de tirosina (Y) e glicina (G) foram encontrados no StyMaV 3 (YRAG/G). Além das funções de supressão do silenciamento gênico, processamento da poliproteína e transmissão, a proteína HC-Pro também está relacionada ao processo de amplificação do genoma, no movimento sistêmico do vírus e na sintomatologia (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). O motivo IGN é conservado e é importante para o desempenho de outras funções dessa proteína como a amplificação do genoma e no movimento sistêmico do vírus, porém, não foi encontrado em nenhum dos três vírus caracterizados, mas foi encontrado o motivo IGK que pode estar relacionado com uma dessas funções. Já o motivo FRNK que é outro motivo conservado e que está associado à supressão de silenciamento gênico e expressão de sintomas não foi localizado em nenhum dos três vírus. Essas são diferenças marcantes nos novos vírus encontrados e sua implicação biológica deve ser estudada.

A proteína NIa-Pro é a protease mais bem estudada, atua tanto em *cis*, na clivagem NIa/NIb, quanto em *trans* na clivagem das demais proteínas, apresenta, na maioria das vezes, a sequência conservada XX(V/G)XX(Q/E)/(S/G/A) (Adams *et al.*, 2005b) e que no caso de StyMaV 1, StyMaV 2 e StyMaV 3 o sítio de clivagem é VSYQ/G. A clivagem da junção P3/6K1 libera a proteína P3 que é uma proteína envolvida com a patogenicidade e replicação do complexo viral de replicação do genoma. É uma proteína que pode ser encontrada associada à CI (Rodriguez-Cerezo *et al.*, 1993) e NIb (Langenberg & Zang, 1997) desempenhando essas funções. Essa proteína foi encontrada nos sítios YTVG/G para o StyMaV 1 e StyMaV 2, e VVYE/S para o StyMaV 3. As proteínas 6K1 e 6K2 são

pouco estudadas, dessa forma, não há relatos de motivos conservados em suas sequências, a não ser os que estão relacionados à protease NIa-Pro e nos sítios de clivagem nas junções 6K1/CI e 6K2/NIa-Pro que liberam as duas proteínas que possuem massa molecular de 6kDa cada uma (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). A proteína 6K1 é necessária para a replicação viral, é um elemento importante na fase de infecção precoce e especula-se que esta pode estar envolvida com a P3 quanto a patogenicidade e replicação do genoma viral (Cui & Wang, 2016; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Já a proteína 6K2, é responsável pela ligação do complexo viral, portanto, associa-se às vesículas do retículo endoplasmático ancorando o complexo replicativo às membranas, sendo também, importante para a amplificação do genoma (Sachad *et al.*, 1997; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Os sítios de clivagem para a proteína 6K1 encontrado foi o mesmo para StyMaV 1 e StyMaV 2 (IQFQ/S), e XXDE/V para StyMaV 3. Para a proteína 6K2 os sítios encontrados foram ISFE/G para StyMaV 1, VVFE/G para StyMaV 2 e VAYE/G para StyMaV3.

A proteína CI é a responsável pela formação dos corpos de inclusões citoplasmáticas (CI) do tipo cata-vento, desempenha a atividade de helicase e está envolvida no movimento célula-a-célula (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Ela é liberada pela clivagem da junção CI/6K2, e o sítio dessa clivagem apresentado por StyMaV 1 e StyMaV 2 foi IKGQ/S e por StyMaV 3 foi VLFE/G. Existe um motivo conservado responsável pela ligação da CI à nucleotídeos trifosfatos (NTP) (Kadare & Haenni, 1997), que é o motivo GXXGXGKS e que foi encontrado nos novos membros da família *Potyviridae* em estilosantes. Outro motivo conservado importante e que está envolvido com a atividade helicase na hidrólise de ATP também foi encontrados nesses novos vírus (Riechmann *et al.*, 1992). Com base nessas características dessa proteína, segundo Adams *et al.* (2005a), a proteína CI pode ser utilizada para critérios taxonômicos na delimitação de novas espécies dentro da família *Potyviridae* assim como a HC-Pro, CP e NIb, levando em consideração que 78,3% de identidade nucleotídica é o limiar para o critério de demarcação de nova espécie. Sendo assim, a identidade de nucleotídeo da CI variou de 34-52% para os três vírus, quando comparados às espécies tipo de cada gênero dentro da família descritos na Tabela 2.4. Com isso, os três vírus em estudo estão abaixo do limiar de demarcação de nova espécie. Esses dados confirmam que os vírus em estudos representam novas espécies dentro da família *Potyviridae*.

NIa-Pro é liberada na clivagem NIa/NIb em *cis* e apresenta dois domínios: um que refere-se à proteína VPg-NIa na porção N-terminal e outro que refere-se à protease NIa-Pro na porção C-terminal (Riechmann *et al.*, 1992). A análise da sequência do sítio de clivagem de NIa nos três vírus, revelou a presença deste resíduo, encontrado no contexto VSYQ/G. Assim, como a HC-Pro, CP, CI e a NIb, sugere-se também a utilização das

sequências das proteínas NIa-Pro no critério de demarcação de nova espécie, por possuírem padrões quando comparados aos da ORF completa (Adams *et al.*, 2005a). A proteína NIb representa a polimerase (RNA polimerase dependente de RNA-RdRp) viral, e por isso possui a função principal de síntese de novas cópias de RNA, sendo também uma das proteínas mais conservadas entre os membros da família *Potyviridae* (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Lain *et al.*, 1990). Esta proteína é liberada pela clivagem da junção NIb/CP, na qual ocorre no contexto ITFQ/E para o StyMaV 1 e StyMaV 2 e KETV/A para o StyMaV 3.

A proteína da capa protéica (CP) é encontrada em grande quantidade e utilizada para critérios taxonômicos. Antes das técnicas de sequenciamento, as espécies e estirpes eram distinguidas usando técnicas tradicionais como a gama de hospedeiras, sintomatologia e sorologia. Porém, muitas vezes, essas ferramentas não se mostravam eficientes para fazer distinções. Sendo assim, sequências disponíveis da capa protéica e do genoma completo, esclarecem, aperfeiçoam a taxonomia e inserem espécies em determinados gêneros dentro da família. Com base nisso, criou-se um parâmetro que instituiu um critério taxonômico baseado na capa protéica, podendo ser permitido distinguir melhor espécie de estirpe (Adams *et al.*, 2005b). De acordo com Shukla e Ward (1988) existem algumas razões as quais a proteína da capa protéica pode ser usada como critério taxonômico. Pelo fato da CP possuir a sequência de aminoácidos que pode ter pouca ou nenhuma semelhança de sequência com relação aos diferentes grupos de vírus de planta, ser encontrado em grande quantidade no vírus, correspondendo a mais de 90% da massa da partícula viral podendo ser obtida de forma suficientemente pura e quanto às suas propriedades sorológicas que refletem a estrutura da proteína da capa, esta proteína torna-se importante para o uso como critério taxonômico. Dessa forma, a capa protéica vem sendo amplamente aplicada com fins taxonômicos, e o limiar estabelecido como critério de discriminação de espécie foi de 80% de identidade de aminoácidos e de 76-77% de nucleotídeos (Adams *et al.*, 2005a).

A proteína da CP é multifuncional e desempenha papéis fundamentais na encapsidação do RNA viral, transmissão pelo vetor (Shukla & Ward, 1989; Atreya *et al.*, 1990; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001) e movimentos à curta distância (Kasteel *et al.*, 1993; Dolja *et al.*, 1994). Quanto à sua estrutura, é uma proteína dividida em três domínios, onde cada região apresenta um nível de conservação diferente. Nesse estudo é relevante destacar que baseado no banco de referência (GenBank), as comparações genômicas demonstraram que a identidade de aminoácido da CP de StyMaV 1 e StyMaV 2 é de 40,42% e 41,13%, respectivamente, com relação ao BVY e de 71,63% entre eles. Para o StyMaV 3 é de 58,57% com relação ao RoYMV, 26,23% com relação ao StyMaV 1 e 29,01% com relação ao StyMaV 2. Quanto à identidade de nucleotídeos da CP, os resultados foram mais variáveis, StyMaV 1 apresentou 43% com relação aos vírus

ChYNMV (*Macluravirus*), WSMV (*Tritimovirus*) e BaYMV (*Bymovirus*). O *Stylosanthes mosaic associated virus 2* apresentou 44,06% com relação ao RgMV (*Rymovirus*) e 72,21% com relação ao StyMaV 1. Já o StyMaV 3 apresentou 47,18% com relação ao RoYMV, 52,16% com relação ao StyMaV 1 e 47,81% com relação ao StyMaV 2. Portanto, os dados de identidade indicam que o StyMaV 3 representa uma nova espécie e provavelmente um novo gênero. Os dados de transmissão e os vetores envolvidos com esses novos membros da família *Potyviridae* serão essenciais para a classificação definitiva desses novos vírus dentro da família. Quanto aos domínios variáveis, N-terminal e C-terminal, esses estão relacionados com a capacidade de transmissão do vetor e movimentos de curta e longa distância (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Quanto ao domínio central da proteína CP, apresenta uma relação com a encapsidação do material genético, sendo assim, essenciais para a montagem e estabilidade da partícula (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

A proteína PIPO (Pretty Interesting Potyviridae ORF), pode ser considerada como sendo outra ORF (Chung *et al.*, 2008). Foi identificada pela primeira vez em *Turnip mosaic virus* e encontra-se presente dentro do cístron da P3. Nos novos vírus de estilosantes, ela foi identificada em StyMaV 1 entre os nucleotídeos na posição 873-978, no StyMaV 2 na posição 2.602-2919 e no StyMaV 3 na posição 984-1060. Até o momento, pouco é conhecido a respeito dos mecanismos de tradução envolvidos na expressão da PIPO e suas funções no ciclo de replicação dos potyviruses (Chung *et al.*, 2008).

2.4.2. Diversidade de novos membros da família *Potyviridae* infectando *Stylosanthes guianensis*, círculo de hospedeiros e potenciais vetores

Como forma de compreender a diversidade entre esses novos vírus encontrados em estilosantes e a especificidade de hospedeiros, foram desenhados *primers* para amplificação do gene CP, que foram clonados e sequenciados num total de 30 clones analisados. A análise filogenética do gene da CP revelou a presença de três novos vírus em estilosantes. De acordo com o banco de referência, dois deles (StyMaV 1 e StyMaV 2) estão mais próximos ao vírus já existente na família que é o *Blackberry virus Y*, membro do gênero *Brambyvirus*, porém, esses dois novos vírus, apresentam uma baixa identidade na sequência de nucleotídeo e aminoácido da CP. Já o outro vírus (StyMaV 3), está mais próximo ao *Rose yellow mosaic virus*, outro membro da família *Potyviridae*, mas que ainda não se encontra classificado em nenhum gênero. Ambos possuem uma baixa identidade na sequência de nucleotídeos e aminoácidos da CP. Quanto a análise da sequência nucleotídica da poliproteína, esta revelou que dois desses novos vírus (StyMaV 1 e StyMaV 2) podem constituir um novo gênero dentro da família e o terceiro vírus

(StyMaV 3), representa um outro novo gênero distinto. Essa nova proposta taxonômica pode ser visualizada nas árvores filogenéticas geradas a partir das sequências genômicas completas (nucleotídeos e aminoácidos) e nos agrupamentos virais provenientes dessas análises (Figuras 2.9 e 2.10).

Nas análises preliminares das características biológicas desses três novos vírus, considerando que esses foram isolados de plantas que fazem parte do banco ativo de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, é possível deduzir que hospedeiras alternativas ainda não identificadas no campo e práticas dos programas de melhoramento podem estar contribuindo com a disseminação desses vírus para outras regiões do país, já que a Embrapa é responsável por 85% do mercado de forrageiras no Brasil. Apesar da escassez de estudos sobre os impactos econômicos destes vírus em leguminosas forrageiras, assim como, os resultados preliminares que indicam que a gama de hospedeiras desses três novos vírus é restrita, esse estudo mostrou que esses vírus podem ser problemas potenciais em culturas de grande interesse econômico como feijão e soja. Os resultados obtidos via inoculação mecânica de diversas espécies de plantas, indicam que pelo menos o StyMaV 3 é capaz de infectar plantas da família Fabaceae, como o feijão. Experimentos complementares necessitam ser realizados para estudar a capacidade efetiva desses vírus em causarem danos econômicos em plantas cultivadas. A diferença na filogenia entre essas três novas espécies de vírus pode representar também uma especificidade a esses hospedeiros e/ou potenciais vetores. Experimentos preliminares também possibilitaram a detecção via RT-PCR do StyMaV 1 em cigarrinhas que se encontravam infestando as plantas sintomáticas de estilosantes. Esse resultado, no entanto, necessita ser complementado comprovando que esses insetos são vetores do vírus. Além disso, os vetores dos vírus StyMaV 2 e StyVaV 3 necessitam ser determinados e devem ser alvos de trabalhos futuros com esses novos vírus.

Este trabalho também demonstrou que a utilização da técnica de NGS e sua viabilidade para o estudo da diversidade viral, descoberta de novas espécies, como também para obter genomas virais completos tem se tornado um método eficiente. Uma grande variedade de técnicas, das mais tradicionais às mais modernas, pode ajudar na detecção e identificação de novos vírus. Por mais bem sucedidas que as técnicas tradicionais sejam, elas apresentam algumas desvantagens, principalmente na identificação de patógenos desconhecidos. Sendo assim, uma das vantagens na utilização do NGS é a não exigência em se conhecer previamente o agente infeccioso. No Brasil, esta ferramenta ainda tem uma aplicação limitada, sendo este grupo de pesquisa um dos pioneiros na utilização dessa técnica.

2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi realizado o primeiro relato de três vírus infectando estilosantes no Brasil, denominados até o momento, de *Stylosanthes mosaic associated virus 1*, *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e *Stylosanthes mosaic associated virus 3*. Foram caracterizados molecularmente, a partir do sequenciamento de alto desempenho do extrato combinado de amostras sintomáticas de *Stylosanthes guianensis* coletadas em campos de melhoramento genético da Embrapa Gado de Corte-MS. Estes vírus pertencem à família *Potyviridae* e seguindo os critérios taxonômicos da família, eles constituem dois novos gêneros. Um desses vírus (*StyMaV 1*) foi detectado em cigarrinha, indicando que, este inseto pode ser um vetor potencial desse vírus. No entanto, esta constatação será melhor estudada em futuros trabalhos de estudo de transmissão desses novos vírus. Os estudos de filogenia baseados em sequências da poliproteína demonstraram a existência de pelo menos dois novos gêneros dentro da família, sendo um deles composto pelos *Stylosanthes mosaic associated virus 1* e *Stylosanthes mosaic associated virus 2* e um segundo novo gênero formado pelo *Stylosanthes mosaic associated virus 3*. O *Stylosanthes mosaic associated virus 3* foi capaz de infectar feijão comum através de transmissão mecânica, mostrando assim, que esta pode ser uma potencial hospedeira desse vírus. Esta observação representa uma ameaça para importantes espécies cultivadas e o círculo de hospedeiro mais abrangente será continuado visando determinar a importância e impacto da infecção desse vírus em diferentes variedades de feijão e soja. Tais estudos serão realizados também mais extensivamente com os *StyMaV 1* e *StyMaV 2*. As informações geradas nessa dissertação, assim como, nos experimentos complementares a serem realizados, serão utilizadas no Programa de Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras da Embrapa Gado de Corte, visando o desenvolvimento de linhagens resistentes a esses vírus. Futuramente, estudos de interação entre esses três vírus, estudos com potenciais vetores e suas plantas hospedeiras serão conduzidos para o melhor entendimento desses novos tipos de interação vírus/hospedeiro/vetor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, I. P.; GLOVER, R. H.; MONGER, W. A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. *Mol. Plant. Pathol.*, v. 10, p. 537-545, 2009.

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol. Plant Pathol.*, v. 6, p. 471-487, 2005a.

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch. Virol.*, v. 150, p.459-479, 2005b.

ADAMS, M. J.; ZERBINI, F. M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D. C.; VALKONEN, J. P. T. *Virus Taxonomy. Nine Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. New York: Academic Pres, 1327 p., 2011.

ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G. J.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, A. A.; SMITH, T. H.; VANCE, V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc natl Acad sci*, v. 95, p. 13079-13084, 1998.

ANDERSON, S., BANKIER, A. T., BARRELL, B. G., De BRUIJIN, M. H., COULSON, A. R., DROUIN, J., EPERON, I. C., NIERLICH, D. P., ROSE, B. A., SANGER, F., SCHREIER, P. H., SMITH, A. J., STADEN, R. e YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-65. 1891.

ANDRADE, C. M. S. Construindo um ideótipo de gramínea para consorciação com a leguminosa Estilosantes Campo Grande. In: *Construção de ideótipos de gramíneas para usos diversos*. EMBRAPA. Brasília, DF, 2013

ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L.; SALES, M. F. L. Estilosantes Campo Grande: Leguminosa recomendada para solos arenosos do Acre. Rio Branco: Embrapa Acre, 2010. 12p. (Embrapa Acre. Circular técnica, 55).

ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, 2000, Lavras. Anais... Lavras: UFLA. p. 273-309. 2001.

ATREYA, C. D.; RACCAH, B.; PIRONE, T. P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, v. 178, n. 1, p. 161-165, 1990.

BAER, R., BANKIER, A. T., BIGGIN, M. D., DEININGER, P. L., FARRELL, P. J., GIBSON, T. J., HATFULL, G., HUDSON, G. S., SATCHWELL, S. C., SEGUIN, C. e Et Al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, 207-11. 1984.

BARBA, M.; HADIDI, A. RNA silencing and viroids. *J. Plant. Pathol.* v. 91, p. 243-247, 2009.

BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*, v. 6, p. 106136, 2014.

BARBOSA, F. A.; SOARES-FILHO, B. S.; MERRY, F. D.; AZEVEDO, H. O.; COSTA, W. L. S.; COE, M. T.; BATISTA, E. L. S.; MACIEL, T. G.; SHEEPERS, L. C.; OLIVEIRA, A. R.; RODRIGUES, H. O. Cenários para a pecuária de Corte amazônica. Centro de Sensoriamento Remoto e Escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Aliança da Terra. Virginia Tech Woods Hole Research Center, 2015.

BARCELLOS, A. O.; ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T.; VILELA, L. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17., 2001. Piracicaba. Anais... Piracicaba: Fealq, 2001. P. 365-425.

BARZON, L.; LAVEZZO, E.; MILITELLO, V.; TOPPO, S.; PALÙ, G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 12, p. 7861-7884, 2011.

BARZON, L.; LAVEZZO, E.; COSTANZI, G.; FRANCHIN, E.; TOPPO, S.; PALÙ, G. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology, *Journal of Clinical Virology*, v. 58, p. 346-350, 2013.

BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. A. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopath.*, v. 45, p. 307-328. 2007.

BRACHO, M. A.; MOYA, A.; BARRIO, E. Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *J Gen Virol*, v. 79, n. 12, p. 2921-2928, 1998.

BRANDÃO, M. B.; COSTA, N. M. S. O gênero *Stylosanthes* Swartz no Brasil. Epamig, Minas Gerais, p.107 1982.

BRANDÃO, M. B.; COSTA, N. M. S. O gênero *Stylosanthes* Swartz no Estado de Minas Gerais. Epamig, p.52. 1979.

CHEN J, CHEN J, ADAMS M. J. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviriidae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Arch Virol*. 2001;146(4):757-66. 2001.

CHUNG, B. Y.; MILLER, W. A; ATKINS, J. F; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the *Potyviriidae*. *Proc Natl Acad Sci*, v. 105, p. 5897-5902, 2008.

COSTA, N. M. S. Revisão do Gênero de *Stylosanthes* Sw. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, p.470.2006.

CUI, H. & WANG, A. *Plum Pox Virus* 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection. *Journal Virology* 2016 May 15; 90(10): 5119–5131.

DALEY, C. A.; ABBOTT, A.; DOYLE, P. S.; NADER, G. A.; LARSON, S. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutrition Journal*, v. 9, n. 10, 2010.

DIAS-FILHO, M. B. Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação. 4. ed. rev. Belém, PA, 2011.

DOLJA, V.V.; HALDEMAN, R.; ROBERTSON, N. L.; DOUGHERTY, W. G.; CARRINGTON, J. C. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch *Potyvirus* in plant. *Embo J*, v. 13, p. 1482-1491, 1994.

EDWARDSON, J. R. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *American Journal Botany*, v. 53, p. 359-364, 1966.

ELENA, S. F.; RODRIGO, G. Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Curr Opin Virol*, v. 2, p. 719-724, 2012.

FAO. The state of food and agriculture. [online]. Disponível em: <http://bit.ly/dcsAFD> [Acesso 25 jul 2015], 2009.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Eds). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Academic Press. 1259 p. 2005.

FERRAZ, J. B. S; FELÍCIO, P. E. D. Production systems - an example from Brazil. *Meat Science*, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil. Belo Horizonte: EPAMIG, p.107, 1979.

GAL-ON, A.; ANTIGNUS, Y.; ROSNER, A.; RACCAH, B. A *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 2183-2187, 1992.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, v. 63, p. 9-16, 1997.

GIBBS, A. J.; OHSHIMA, K.; PHILLIPS, M. J.; GIBBS, M. J. The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PLoS ONE*, v. 3, e 2523, 2008.

GUO, D.; MERITS, A.; SAARMA, M. Self-association and mapping of interaction domains of helper component proteinase of potato A potyvirus. *J. Gen. Virol.*, v. 80, p. 1127-1131, 1999.

HALGREN, A.; TZANETAKIS, I. E.; MARTIN, R. R. Identification, characterization, and detection of *Black raspberry necrosis virus*. *Phytopathology*, v. 97, p. 44-50, 2007.

HOWELL, W. E.; THOMPSON, D.; SCOTT, S. Virus-like disorders of fruit trees with undetermined etiology. In *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*; 2011.

HULL, R. *Matthew's Plant Virology*. Academic Press, New York, NY, USA, 2002.

HUTCHISON, C. A., 3rd . DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res*, 35, 6227-37.2007

ICTV 2015. International Committee on Taxonomy of Virus [online]. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> [Acesso em 25 jun 2016].

IVANOV, K. I.; ESKELIN, K.; LÖHMUS, A.; MAKINEN, K. Molecular and cellular mechanisms underlying *Potyvirus* infection, *Journal of General Virology*, v. 95, p. 1415-1429, 2014.

JAMES, D.; VARGA, A.; PALLAS, V.; CANDRESSE, T. Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. *Can. J. Plant Pathol.*, v. 28, p. 16-29, 2006.

JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; CALIXTO, S.; GONTIJO-NETO, M. M.; LAURA, V. A.; MACEDO, M. C. M; VALLE, C. B. Preliminary performance of *Panicum maximum* accessions and hybrids in Brazil. In: XX INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, Dublin. Proceedings. Wageningen Academic Publishers: The Netherlands, p. 109, 2005.

KADARE, G.; HAENNI, A. L. Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.*, v. 71, p. 25832590, 1997.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. Caracterização e avaliação preliinar de species forrageiras no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados. In: Simpósio sobre os cerrados, 8ª, Planaltina, DF. Anais de Congresso, 1996.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; CHARCHAR, M. J. D.; GOMES, A. C. Caracterização morfológica de acesso do gênero *Stylosanthes* no banco ativo de germoplasma da Embrapa Cerrados. Coleção 1994/1995. Boletim de desenvolvimento de pesquisa, n. 72. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2002. 24p.

KASTEEL, D.; WELLINK, J.; VERVER, J.; VAN LENT, J.; GOLDBACH, R.; VANKAMMEN, A. The involvement of *Cowpea mosaic virus* M RNA-encoded proteins in tubule formation. *J. Gen. Virol*, v. 74, p. 1721-1724, 1993.

KNUHTSEN, H.; HIEBERT, E.; PURCIFULL, D. E. Partial purification and some properties of *Tabacco* induce intanuclear inclusions. *Virology*, v. 61, p. 200209, 1974.

KING, A. M. Q.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, J. M.; CARSTENS, E. B. *Virus Taxonomy*, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1327 p., 2012.

LAIN, S.; RIECHMANN, J. L.; MARTIN, M. T.; GARCIA, J. A. Homologous *Potyvirus* and *Flavivirus* proteins belongins to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene*, v. 82, p. 357-362, 1990.

LANGENBERG, W. G.; ZHANG, L. Immunocytology shows the presence of *Tobacco etch virus* P3 protein in nuclear inclusions. *J Struct Biol*, v. 118, p. 243-247, 1997.

LEWIS, G. L.; MACKINDER, B.; LOCK, M. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, 578p. 2005.

MAIA, I.G.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J.Gen. Virol*, v. 77, p. 1335-1341, 1996.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [online]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao> [Acesso 10 out 2015], 2015.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R. *Doenças em plantas forrageiras*. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, ISSN 1983-974, 2011.

MARSTON, D. A.; MCELHINNE, Y.; JOHNSON, N.; MULLER, T.; CONZEL, M.; ANN, K.K.; TORDO, N.; FOOKS, A. R. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the GL 3' non-translated region. *J Gen Virol*, v. 88, p. 1302-1314, 2007.

MARSTON, D. A.; MCELHINNEY, L. M.; ELLIS, R. J.; HORTON, D. L.; WISE, E. L.; LEECH, S. L.; DAVID, D.; LAMBALLERIE, X.; FOOKS, A. R. Next generation sequencing of viral RNA Genomes. *BMC Genomics*, v. 14, p. 444, 2013.

MAXAM, A. M. e GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 560-4. 1977.

METZKER, M. L. Sequencing technologies-The next generation. *Nat. Rev. Genet.*, v. 11, p. 31-46, 2010.

MOHLENBROCK, R. H. A revision of the genus *Stylosanthes*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 44(4): 299-355, 1958.

MOHLENBROCK, R. H. Further consideration in *Stylosanthes* (Leguminosae). *Rhodora* (63): 245–258. 1963

MOTT, G. O. Potential productivity of temperature and tropical grassland systems. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 14., 1981, Lexington. Proceedings... Boulder: Westview Press, 1983. P. 35-42.

MUHIRE, B. M.; VARSANI A.; MARTIN, D. P. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE* 9(9): e108277. doi:10.1371/journal.pone.0108277, 2014.

QUAN, P.; BRIESE, T.; PALACIOS, G.; LIPKIN, W. I. Rapid sequence-based diagnosis of viral infection. *Antiviral Res.*, v. 79, p.1-5, 2008.

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

RIECHMANN, J. L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol*, v. 73, p. 1-16, 1992.

RIEDEL, D.; LESEMANN, D. E.; MAISS, E. Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. *Arch. Virol.*, v. 143, p.2133-2158, 1998.

ROBERTS, C. R. Algumas causas comuns dos fracassos das pastagens tropicais de leguminosas e gramíneas em fazendas comerciais e as possíveis soluções. In: SÁNCHEZ, P. A.; TERGAS, L. E.; SERRÃO, E. A. S. Produção de pastagens em solos ácidos dos trópicos. Brasília, DF: Ciat/Embrapa, 1982. p. 433-452.

RODRIGUEZ-CEREZO, E.; AMMAR, E. D.; PIRONE, T. P.; SHOW, J. G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in *Potyvirus* infected cells, J Gen Virol, v. 74, p. 1945-1949, 1993.

ROTT, M. E; JELKMANN, W. *Little cherry virus-2*: sequence and genomic organization of an unusual member of the *Closteroviridae*. Arch. Virol., v. 150, p. 107-123, 2005.

SACHAAD, M. C.; JESEN, P. E.; CARRINGTON, J. C. Formation of plant RNA viral replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum targeted viral protein. EMBO J, v. 16, p. 4049-4059, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 1989.

SANGER, F. The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 191, 317-33. 1975.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of Molecular Biology, 94, 441-8. 1975.

SANGER, F.; COULSON, A. R.; HONG, G. F.; HILL, D. F.; PETERSEN, G. B. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. Journal of Molecular Biology, 162, 729-73. 1982.

SANGER, F.; NICLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proceeding of the National Academy of Sciences U S A, 74, 5463-7. 69. 1977.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. Natural Biotechnology, 26, 1135-45. 2008.

SHUKLA, D. D.; LAURICELLA, R.; WARD, C. W. Serology of Potyviruses: current problems and some solutions. In: BARNETT, O. W. *Potyvirus* Taxonomy, Springer, Wien and New York. Archives of Virology, v. 5, p. 31-46. 1992.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Identification and classification of Potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Archives of Virology, v. 106, p. 171200, 1989.

SHUKLA, D. D.; WARD, C.W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. J Gen Virol, v. 69, p. 2703-2710, 1988.

SOUSA, D. P.; LIMA, K. T; OLIVEIRA, A. L.; QUEIROZ, R. F.; FERNANDES NETO, R. F. P. A. G.; NUNES, E. P. Estudo do taxon genérico *Stylosanthes* (Leguminosae) no estado do Ceará. In: 54º Congresso de Botânica e 3ª Reunião Amazônica de Botânica – Resumos. Belém-Pará, 97p. 2003.

SOUZA, F. H. D.; POTT, E. B.; PRIMAVES, O. I.; BERNARDI, A. C. C.; RODRIGUES, A. Usos alternativos da palhada residual da produção de sementes para pastagens. 1ª ed. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos. SP. v. 1. 241 p., 2006.

SOUZA, F. H. D.; MATTA, F. P.; FÁVERO, A. P. Construção de ideótipos de gramíneas para usos diversos. Embrapa, 2013.

SPAIN, J. M.; VILELA, L. Perspectivas para pastagens consorciadas na América Latina nos anos 90 e futuras. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 28., 1990, Campinas. Anais... Campinas: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990, p. 101-119.

SUSAIMUTHU, J.; TZANETAKIS, I. E.; GERGERICH, R. C.; MARTIN, R. R. A member of a new genus in the *Potyviridae* infects *Rubus*. Virus Research, v. 131, p. 145-150, 2008.

TATINENI, S.; ZIEMS, A. D.; WEGULO, S. N.; FRENCH, R. *Triticum mosaic virus*: a distinct member of the family potyviridae with an unusually long leader sequence. Phytopathology, v. 99, n. 8, p. 943-950, 2009.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. *Potyvirus* protein: a wealth functions. *Virus Research*, v. 74, p.157-175, 2001.

USDA. United States Department of Agriculture [online]. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/international-markets-trade/countries-regions/brazil/> [Acesso 05 dez 2016], 2016.

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. Doenças em forrageiras [online]. Campo Grande, MS, Embrapa Gado de Corte, ISSN 1516-5558. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD50.html> [Acesso 10 out 2015], 2001.

VALLI, A.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; LOPEZ-MOYA, J. J.; GARCIA, J. A. RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of *Cucumber vein yellowing Ipomovirus*, a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HC Pro. *J. Virol.*, v. 80, p. 10055-10063, 2006.

VIRALZONE. [online]. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/294.html [Acesso 10 abr 2016], 2014.

WANG, Z; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* v. 10, p. 57-63, 2009.

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

WEI, T.; WANG, A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant *Potyvirus* replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J Virol*, v. 82, p. 12252-12264, 2008.