

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Identificação e caracterização de dois isolados de cole latent virus que infectam brássicas

Agatha Mota de Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

São Paulo

2019

Agatha Mota de Oliveira

**Identificação e caracterização de dois isolados de cole latent virus que infectam
brássicas**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e
Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:

Professor Dr. Marcelo Eiras

São Paulo

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Agatha Mota de Oliveira

Título: Identificação e caracterização de dois isolados de cole latent virus que infectam brássicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Eiras

Julgamento: _____

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: _____

Dr. Pedro Luis Ramos-González

Julgamento: _____

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: _____

Dr. Leonardo Assis da Silva

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marcelo Eiras pela orientação, oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência, por toda ajuda oferecida durante o desenvolvimento desta dissertação, e por acreditar na minha capacidade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, pelos ensinamentos.

Ao Dr. Alexandre Levi Rodrigues Chaves (Instituto Biológico) pelos ensinamentos, apoio e paciência ao sanar minhas dúvidas e pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos membros da Banca de Defesa de Dissertação de Mestrado, pelas excelentes sugestões e correções apontadas para a melhoria deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ricardo Harakava (Instituto Biológico) pela colaboração no sequenciamento das amostras.

Ao Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima (ESALQ-USP) pelo envio de amostras e pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

À Dra. Leilane Karam Rodrigues por toda a ajuda, ensinamentos, paciência, amizade, risadas, momentos de descontração e por acreditar na minha capacidade.

Ao Dr. Pedro Luis-Ramos González (Instituto Biológico), pelos ensinamentos, excelentes sugestões e por toda a ajuda e coloboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (Instituto Biológico): Maria Amélia Vaz Alexandre, Ligia Maria Lembo Duarte, Alexandre Levi Rodrigues Chaves, Marcelo Eiras, Addolorata Colariccio, Alyne de Fátima Ramos, Leilane Karam Rodrigues, Lucas Araujo de Oliveira, Wallison Bezerra de Jesus, Priscila Megumi Yara, que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste

trabalho, e, principalmente, pela convivência, amizade, ensinamentos, e momentos de descontração.

À Bióloga Deroila Vieira Marinho pela indicação de estágio com o Dr. Marcelo Eiras, no Instituto Biológico, onde inciei, em 2015, como bolsista de Treinamento Técnico 3 (FAPESP), que abriu o caminho para o início da minha jornada acadêmica.

Ao Dr. Alexander Banguela Castillo (Instituto Biológico), pelas análises de bioinformática e montagem das sequências dos isolados virais.

À M.Sc. Camila Chabi-Jesus pela ajuda nos experimentos de 5'RACE e clonagens, que foram fundamentais para concluir o genoma dos isolados virais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (cota do Programa de Pós-Graduação).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos dos Projetos de Auxílio Regular à Pesquisa (proc. 2014/22594-2 e 2015/50076-9), coordenados pelo Dr. Marcelo Eiras, que garantiram a realização deste trabalho.

A todos os amigos e familiares que me incentivaram, apoiaram, compartilharam das minhas alegrias e angústias, e que sempre estiveram disponíveis para me ajudar no que fosse necessário.

OLIVEIRA, Agatha Mota. **Identificação e caracterização de dois isolados de cole latent virus que infectam brássicas**. 2019. 83 f. São Paulo-SP. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

RESUMO

O cole latent virus (CoLV) infecta brássicas e tem sido identificado apenas no Brasil. O vírus possui partículas flexuosas alongadas com cerca de 650 nm de comprimento e genoma constituído por RNA de fita simples poliadenilado com cerca de 8 kb. Apesar do CoLV não ter seu genoma completamente sequenciado, *Cole latent virus* é aceita pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) como espécie definitiva do gênero *Carlavirus*. Diante da escassez de informações da interação vírus-hospedeiros e da inexistência de sequências completas do genoma do CoLV, foram conduzidos testes biológicos e moleculares a partir de espécies e variedades comerciais de brássicas assintomáticas e sintomáticas coletadas nos Estados de Alagoas, Goiás, Paraná, São Paulo e Distrito Federal. Para a confirmação da presença do CoLV, as amostras foram inoculadas mecanicamente em diferentes espécies de plantas indicadoras e de brássicas comerciais e submetidas a RT-PCR utilizando primers específicos para a região 3' do genoma do CoLV. Após a identificação molecular, foram selecionados dois isolados provenientes dos municípios de Divinolândia, SP e Arapiraca, AL, denominados, respectivamente, T25 e T90, que induziam em suas hospedeiras originais (*B. oleracea* var. *acephala*, “couve-manteiga”) sintomas foliares de clareamento de nervuras e mosaico. Para a obtenção da sequência completa dos genomas dos isolados de CoLV selecionados, foi utilizado o sistema de sequenciamento de alto rendimento (HTS) associado à tecnologia HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, USA), sendo as extremidades 5' obtidas por meio de 5'RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*). *Nicotiana megalosiphon* comportou-se como uma eficiente hospedeira experimental, expressando sintomas severos, o que facilitou a triagem das amostras para posteriores testes moleculares. As análises das sequências completas dos dois isolados permitiram a identificação das seis ORFs (*Open Reading Frame*) típicas de *Carlavirus*. As porcentagens de identidade da capa proteica (CP) e replicase (RdRp), quando comparadas com outras espécies de carlavírus, foram inferiores a 67%. Porém, quando os isolados T25 e T90 foram comparados entre si, as identidades foram superiores a 72% para nucleotídeos e 80% para aminoácidos, estando esses valores de acordo com os critérios estabelecidos pelo ICTV para a demarcação de espécies de carlavírus. As sequências parciais da CP dos isolados T25 e T90 foram comparadas com o isolado tipo de CoLV (AY340584.1), obtendo-se valores de identidade superiores a 75%. As sequências genômicas dos isolados T25 e T90 foram depositadas no Genbank e constituem os primeiros registros de genomas completos do CoLV.

Palavras-chave: Brassicaceae, *Carlavirus*, CoLV, Couve, Filogenia, HTS.

OLIVEIRA, Agatha Mota. **Identification and characterization of two cole latent virus isolates that infect brassicas**. 2019. 83 f. São Paulo-SP. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

ABSTRACT

Cole latent virus (CoLV) infects brassicas and has been identified only in Brazil. This virus has elongated flexuous particles of 650 nm in length and its genome consists of a single-stranded RNA of approximately 8,000 nucleotides with a poly-A tail. Although CoLV does not have its genome completely sequenced, *Cole latent virus* is accepted as a definitive species of the genus *Carlavirus* by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Given the lack of information on virus-host interactions and the absence of the whole-genome sequences of CoLV, biological and molecular analyses were carried out on commercial varieties of asymptomatic and symptomatic brassicas collected in the States of Alagoas, Goiás, Paraná, São Paulo and Distrito Federal. Samples were mechanically inoculated in different indicator plants and commercial brassica species and submitted to RT-PCR using specific primers for the 3' region of the CoLV genome. After molecular identification, two isolates were selected from the municipalities of Divinolândia, SP and Arapiraca, AL, respectively, named T25 and T90, which induced in their original hosts (*B. oleracea* var. *acephala*, kale) symptoms of vein clearing and mosaic. To obtain the complete genome sequences of the selected CoLV isolates, high throughput sequencing system (HTS) associated with HiSeq 2500 technology (Illumina, San Diego, USA) was used. Sequences of the 5' ends were obtained by means of 5' RACE (Rapid amplification of cDNA ends). *Nicotiana megalosiphon* was an efficient experimental host, showing severe symptoms, which facilitated the screening of the samples for the molecular tests. Full-genome sequences analysis of both isolates allowed the identification of the six ORFs (Open Reading Frame), typical of the genus *Carlavirus*. Percentage of identity of the coat protein (CP) and replicase (RdRp), when compared to other carlaviruses, were less than 67%. However, when T25 and T90 isolates were compared with each other, it was found values of identity higher than 72% for nucleotides and 80% for amino acids, being these values in agreement to the criteria established by the ICTV for the demarcation of carlavirus species. Partial CP sequences of the T25 and T90 isolates were compared with the CoLV type isolate (AY340584.1), showing values of identity higher than 75%. Genomic sequences of both isolates were deposited in the *Genebank* and constitute the first complete genome sequences of CoLV isolates.

Keywords: Brassicaceae, *Carlavirus*, CoLV, Kale, Phylogeny, HTS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Esquema do “Triângulo de U” (NAGAHARU, 1935) com a representação das relações genéticas entre as seis espécies do gênero *Brassica* (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. nigra*, *B. napus*, *B. juncea* e *B. carinata*) e o número de cromossomos de cada genoma A, B e C e as respectivas hibridações (Figura retirada da internet: *Wikipedia, the free encyclopedia*).....22
- FIGURA 2 - Organizações genômicas dos três gêneros pertencentes à subfamília *Quinvirinae*: *Carlavirus*, *Foveavirus* e *Robigovirus*. A ORF 1 codifica a replicase viral, as ORFs 2, 3 e 4 formam o *Triple Gene Block* (TGB) que codificam proteínas associadas ao movimento do vírus célula a célula, a ORF 5 codifica a capa proteica (CP) viral e a ORF 6, presente somente nas espécies do gênero *Carlavirus*, codifica uma proteína (11 kDa) rica em cisteína associada à supressão de silenciamento gênico. Figura adaptada de Adams *et al.* (2004).....29
- FIGURA 3 – Esquemas da morfologia, organização genômica e expressão das proteínas das espécies do gênero *Carlavirus*. (A) Partícula flexuosa alongada com 610-700 nm de comprimento e 12-15 nm de diâmetro, com a representação das subunidades da proteína da capa (CP), em azul, envolvendo a fita simples de RNA; (B) Esquema da organização genômica dos carlavírus, indicando a posição de cada ORF e localização dos RNAs subgenômicos: **ORF 1** codifica a replicase viral, proteína com 223 kDa com quatro domínios: metiltransferase (Mtr), *papain-like protease* (P-Pro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); **ORFs 2, 3 e 4** formam o triplo bloco gênico (*Triple Gene Block*, TGB) que codificam proteínas associadas ao movimento do vírus célula a célula (MP); **ORF 5** codifica a capa proteica (CP) do vírus; e **ORF 6** codifica uma proteína rica em cisteína (*RNA-Binding Protein*, RBP), com atividade associada à supressão de silenciamento gênico. As ORFs do terminal 3’ são traduzidas por dois RNAs subgenômicos, sgRNA (que não são encapsidados) de 1,3 kb e 2,6 kb.....32
- FIGURA 4 – Estados brasileiros e cidades onde foram coletadas as amostras de brássicas..... 38
- FIGURA 5 - 1A e 2A – Folhas de plantas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) com sintomas de clareamento de nervuras e mosaico induzidos pelo isolado de carlavírus T90; 1B e 2B – Folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) com

sintomas de clareamento de nervuras e mosaico induzidos pelo isolado T25.....	38
FIGURA 6 - Esquema da organização genômica de espécies de carlavírus com os respectivos sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas RT-PCR. Informações dos oligonucleotídeos estão representados na Tabela 6.....	45
FIGURA 7 – Sintomas de cole latent virus (CoLV) em folhas inoculadas: B) com o isolado T25 de couve (proveniente de Divinolândia, SP) e C) com o isolado T90 (proveniente de Arapiraca, AL); Folhas de <i>C. giganteum</i> : 1A – sadia, 1B-com lesões locais necróticas, 1C– com lesões locais; Folhas de <i>N. megalosiphon</i> : 2A – sadia, 2B – com clareamento de nervuras; 2C –com mosaico e deformação foliar; Folhas de couve-flor: 3A – sadia, 3B –sem sintoma; 3C –com “mild” mosaico; Folhas de couve-rábano: 4A – sadia, 4B – mosaico; 4C –com mosaico amarelo.....	55
FIGURA 8 – Plantas de <i>Nicotiana megalosiphon</i> , 20 dias após as inoculações: A – planta inoculada com o isolado T25 com sintomas de mosaico, deformações foliares, bolhas e atraso no desenvolvimento; B – planta inoculada com o isolado T90 apresentando lesões locais necróticas nas folhas inoculadas e início de mosaico nas folhas mais novas. C – planta sadia de <i>N.megalosiphon</i>	56
FIGURA 9 – Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) de cortes ultrafinos e preparações rápidas de extratos foliares (<i>leaf-dip</i>) de folhas de couve infectadas provenientes de diferentes Regiões do Brasil: 1– <i>Leaf-dip</i> de folha de couve proveniente de Pinhais (PR), onde podem ser visualizadas partículas alongadas e flexuosas com cerca de 650 nm de comprimento; 2A – Corte ultrafino de folha de couve, proveniente de Pirenópolis (GO), em que podem ser visualizadas inclusões citoplasmáticas típicas daquelas induzidas por carlavírus; 2B – <i>Leaf-dip</i> da amostra de couve de Pirenópolis com partículas típicas de carlavírus; 3A e 3B – Cortes ultrafinos de folha de couve, proveniente de Arapiraca (AL), em que podem ser visualizadas inclusões citoplasmáticas típicas de carlavírus. (Imagens: Dr. E.W. Kitajima, NAP-MEPA, ESALQ, USP). Parede celular (PC), mitocôndria (MT), cloroplasto (CL), inclusão citoplasmática (In).....	57
FIGURA 10 – Matriz de identidade de nucleotídeos do fragmento de 120 pb dos isolados de cole latent virus (CoLV) de brássicas. Sequência do isolado identificado como CoLV (AY340584) foi obtida no <i>Genbank</i> (depositada por Belintani <i>et al.</i>) As informações sobre os isolados constam da Tabela 4 (item 4.1). Informações sobre a	

porção genômica sequenciada constam da Tabela 7(item 4.10) e Figura 6 (item 4.9).....	58
FIGURA 11 – Matriz de identidade de nucleotídeos do fragmento de 940 pb dos isolados de cole latent virus (CoLV) de brássicas. Sequência do isolado identificado como CoLV (AY340584) foi obtida no <i>Genbank</i> (depositada por Belintani <i>et al.</i>). As informações sobre os isolados constam da Tabela 4 (item 4.1). Informações sobre a porção genômica sequenciada constam da Tabela 7 (item 4.10) e Figura 6 (item 4.9).....	59
FIGURA 12 – Organizações genômicas dos dois isolados de cole latent virus (CoLV), T25 (código de acesso <i>Genbank</i> : MK684348) e T90 (código de acesso <i>Genbank</i> : MK770418), sequenciados neste trabalho. As barras pretas numeradas correspondem às moléculas de RNA com 8538 e 8524 nucleotídeos dos isolados T25 e T90, respectivamente. ORF 1 codifica a replicase viral, proteína com 223 kDa com quatro domínios: metiltransferase (Mtr), <i>papain-like protease</i> (P-Pro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); ORFs 2, 3 e 4 formam o triplo bloco gênico (<i>Triple Gene Block</i> , TGB) que codificam proteínas associadas ao movimento do vírus célula a célula (MP); ORF 5 codifica a capa proteica (CP) do vírus; e ORF 6 codifica uma proteína rica em cisteína (<i>RNA-Binding Protein</i> , RBP), com atividade associada à supressão de silenciamento gênico.....	61
FIGURA 13 – Matriz de identidade de nucleotídeos da ORF1 (replicase) de isolados de carlavírus que possuem sequência completa depositada no <i>Genbank</i> . As informações referentes aos isolados utilizados nessas análises constam da Tabela 7.....	62
FIGURA 14 – Matriz de identidade de aminoácidos da ORF1 (replicase) de isolados de carlavírus que possuem sequência completa depositada no <i>Genbank</i> . As informações referentes aos isolados utilizados nessas análises constam da Tabela 7.....	63
FIGURA 15 – Matriz de identidade de nucleotídeos da ORF 5 (capa proteica) de isolados de carlavírus que possuem sequência completa depositada no <i>Genbank</i> . As informações referentes aos isolados utilizados nas análises constam da Tabela 7.....	63
FIGURA 16 – Matriz de identidade de aminoácidos da ORF 5 (capa proteica) de isolados de carlavírus que possuem sequência completa depositada no <i>Genbank</i> . As	

informações referentes aos isolados utilizados nas análises constam da Tabela 7.....	64
FIGURA 17 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança (<i>bootstrap</i> para 1500 replicações) obtida a partir do alinhamento múltiplo de sequências completas de nucleotídeos da ORF 1, que codifica a replicase viral, dos isolados T25 e T90 caracterizados neste trabalho (triângulos) e outras espécies membros da família <i>Betaflexiviridae</i> (subfamílias <i>Quinvirinae</i> e <i>Trivirinae</i>). Os códigos de acesso do <i>GenBank</i> de cada isolado e respectivos acrônimos constam da Tabela 3.....	65
FIGURA 18 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança (<i>bootstrap</i> para 1500 replicações) obtida a partir do alinhamento múltiplo de sequências de nucleotídeos da ORF 5, que codifica a capa proteica (CP), de dos isolados T25 e T90 caracterizados neste trabalho (triângulos) e outras espécies da família <i>Betaflexiviridae</i> (subfamílias <i>Quinvirinae</i> e <i>Trivirinae</i>).. Os códigos de acesso do <i>GenBank</i> de cada isolado e respectivos acrônimos constam da Tabela 3.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Vírus que infectan brássicas no Brasil e no mundo.....	23
TABELA 2 – Número de espécies, subfamílias e gêneros aceitos pelo <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (ICTV) na Família <i>Betaflexiviridae</i> , Ordem <i>Tymovirales</i> , Domínio <i>Riboviria</i>	27
TABELA 3 – Espécies aceitas pelo <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (ICTV) na subfamília <i>Quinvirinae</i> e gênero <i>Carlavirus</i>	28
TABELA 4 – Relação das amostras de brássicas coletadas em diferentes Estados brasileiros.....	37
TABELA 5 – Espécies botânicas avaliadas em testes de transmissão mecânica dos isolados T25 e T90.....	40
TABELA 6 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR para amplificação de fragmentos dos isolados de CoLV.....	45
TABELA 7 – Sequências completas de isolados virais, depositadas no <i>Genbank</i> , utilizados nas análises filogenéticas e de identidade de <i>Carlavirus</i>	47
TABELA 8 – Identificação de turnip mosaic virus (TuMV), cole latent virus (CoLV) e cauliflower mosaic virus (CaMV) nas amostras de brássicas por meio de RT-PCR com <i>primers</i> específicos para o turnip mosaic virus (TuMV) e cole latent virus (CoLV), e PCR para o cauliflower mosaic virus (CaMV).....	52
TABELA 9 – Teste biológico em plantas indicadoras pertencentes a diferentes famílias botânicas e RT-PCR com <i>primers</i> específicos para a detecção dos isolados de cole latent virus (CoLV) na amostra T25, proveniente de Divinolândia, SP, e T90, proveniente de Arapiraca, AL.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Origem, importância econômica e social das hostaliças.....	18
2.2. Brássicas: origem, classificação e características.....	21
2.3. Viroses em brássicas e influência das plantas de vegetação espontânea.....	22
2.4. Cole latent virus: o ‘vírus latente da couve’.....	25
2.5. Aspectos relacionados à transmissão do CoLV	32
3. OBJETIVOS.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Isolados virais.....	37
4.2. Armazenamento de folhas infectadas.....	39
4.3. Obtenção de plantas para realização dos testes biológicos.....	39
4.4. Inoculação mecânica.....	40
4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	41
4.6. PTA-ELISA (<i>Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent assay</i>).....	41
4.7. Extração de RNA total.....	43
4.8. Extração de DNA.....	43
4.9. RT-PCR (<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>).....	44
4.9.1. Análise da diversidade genética dos isolados virais.....	46
4.10. Sequenciamento de alto rendimento e montagem das sequências genômicas virais.....	46
4.10.1. Amplificação do extremo 5’ dos genomas virais.....	49
4.10.2. Clonagem e sequenciamento dos fragmentos de genoma viral.....	50
4.11. Detecção de infecções virais.....	51

5. RESULTADOS.....	52
5.1. Avaliação da gama de hospedeiros dos isolados coletados nas regiões produtoras do Brasil.....	52
5.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das amostras de plantas infectadas com isolados do CoLV.....	56
5.3. Sequenciamento e análises das sequências.....	58
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÕES.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. Introdução

As brássicas pertencem à família Brassicaceae, e tem sua origem atribuída à região do Mediterrâneo e Ásia, sendo distribuídas, posteriormente, para todo continente europeu e outras regiões do mundo, incluindo a América do Sul. Possuem ciclo perene ou anual e, apesar da sua variabilidade morfológica, a maioria das espécies possui porte herbáceo (CAMARGO FILHO & CAMARGO, 2010). As brássicas cultivadas, dos gêneros *Brassica* e *Raphanus*, destacam-se na produção agrícola brasileira, porém fatores edafoclimáticos e o manejo inadequado em áreas de cultivo propiciam o estabelecimento de pragas e doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, que podem influenciar a qualidade e a quantidade da produção. No mundo, os vírus relatados em brássicas são: turnip yellows virus (TuYV, gênero *Polerovirus*, família *Luteoviridae*), cucumber mosaic virus (CMV, gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae*), radish mosaic virus (RaMV, gênero *Comovirus*, família *Secoviridae*), ribgrass mosaic virus (RMV, gênero *Tobamovirus*, família *Virgaviridae*), turnip crinkle virus (TCV, gênero *Betacarmovirus*, família *Tombusviridae*), turnip yellow mosaic virus (TYMV, gênero *Tymovirus*, família *Tymoviridae*), cauliflower mosaic virus (CaMV, gênero *Caulimovirus*, família *Caulimoviridae*), turnip mosaic virus (TuMV, gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*) e **cole latent virus** (CoLV, gênero *Carlavirus*, família *Betaflexiviridae*) (SHATTUCK, 1992; ICTV, 2019). O CaMV e o TuMV são os vírus que causam maiores danos e perdas econômicas na cultura de brássicas nas diferentes áreas produtoras de regiões de clima temperado, subtropical e tropical, incluindo o Brasil (KITAJIMA *et al.*, 1970; COSTA *et al.*, 1980; CUPERTINO *et al.*, 1986; RODRIGUES, 2019).

Por sua vez, CoLV é a única espécie carlavírus relatada exclusivamente no Brasil que infecta brássicas cultivadas, sendo os aspectos e importância epidemiológicos, relacionados à transmissão por afídeos e ao papel das plantas da vegetação espontânea como reservatório do CoLV ainda desconhecidos. No campo, a transmissão é realizada de modo não circulativo (não persistente) por diferentes espécies de afídeos vetores (Ordem Hemiptera, Subordem Sternorrhyncha, Família Aphididae) (COSTA *et al.*, 1972; MELLO *et al.*, 1987; BELINTANI *et al.*, 2002; EIRAS *et al.*, 2008).

Os vírus que infectam brássicas, no Brasil, como raiz-forte (*Armoracia rusticana*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), rúcula (*Eruca sativa*), brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), mostarda (*Brassica juncea*), rabanete (*Raphanus sativus*), couve (*B. oleracea* var. *acephala*), nabo (*Brassica rapa*) e couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *Pekinensis*) podem induzir diferentes sintomas. Os isolados de TuMV podem causar sintomas foliares de clareamento de

nervuras, bolhas, deformações severas, redução do tamanho da planta, anéis cloróticos e necróticos e mosaico e, em alguns casos extremos, podem causar a redução do porte e morte da planta. Esses sintomas variam de acordo com o grau de severidade do isolado viral, estágio de desenvolvimento da planta no momento da infecção, suscetibilidade da espécie ou da variedade da planta hospedeira, condições ambientais e coinfeções com outras espécies de vírus (TOMLINSON, 1970). Isolados de CaMV podem induzir sintomas foliares de pontos cloróticos, mosqueado, mosaico e deformações foliares e, em alguns casos, a infecção pode transcorrer sem a indução de sintomas (SAUNDERS *et al.*, 1990).

No caso específico dos isolados de CoLV, frequentemente as infecções são assintomáticas. Porém, algumas vezes, observa-se, tanto no campo quanto em inoculações experimentais, clareamento de nervuras e um mosaico brando em variedades de *Brassica oleracea* (couve e couve-flor) (KITAJIMA *et al.*, 1970). É muito difícil associar, no campo, a espécie de vírus que é responsável pelos sintomas observados em brássicas, pois coinfeções virais podem ser recorrentes. Um exemplo de coinfeção de CoLV com TuMV foi relatado em plantas de raiz-forte que apresentavam sintomas foliares severos de mosaico e anéis sistêmicos (Eiras *et al.*, 2008). Estes mesmos autores constataram que plantas de raiz-forte, infectadas somente com TuMV, apresentavam os mesmos sintomas observados nas coinfeções de TuMV e CoLV, não sendo possível associar algum tipo de sinergismo entre estes vírus, uma vez que não foi detectada a ocorrência de plantas de raiz-forte infectadas somente com o CoLV. No campo, as coinfeções entre potyvírus e carlavírus parecem ser comuns (EIRAS, M., comunicação pessoal). Outro exemplo de coinfeções encontradas com certa frequência em campos de produção de brássicas é de CoLV e CaMV, porém os efeitos dessas coinfeções ainda não foram mensurados (RODRIGUES, 2019). Os danos causados pelos vírus em brássicas podem levar à desvalorização do produto final, principalmente em função dos sintomas que podem se manifestar nas folhas (couve, mostarda e rúcula), nas inflorescências (couve-flor, brócolis) e raízes (nabo, rabanete e raiz-forte), dificultando ou inviabilizando a sua comercialização (FAYAD-ANDRÉ *et al.*, 2011; MITUTI, 2009; FAJARDO *et al.*, 2001). No caso do CoLV, tanto sua incidência quanto o potencial de danos e perdas são fatores ainda desconhecidos.

Espécies de brássicas da vegetação espontânea podem ter um papel fundamental na epidemiologia do CoLV e de outras espécies de vírus que infectam brássicas comerciais, atuando como reservatórios de vírus e hospedeiras de afídeos vetores (PALLET *et al.*, 2002). No entanto, não há estudos envolvendo espécies de plantas da vegetação espontânea e se desconhece o seu papel como reservatório do CoLV.

O CoLV pertence ao gênero *Carlavirus*, subfamília *Quinvirinae*, família *Betaflexiviridae*, ordem *Tymovirales*, domínio *Riboviria* (IGORI *et al.*, 2016; ICTV, 2019; SIDDELL *et al.*, 2019). Suas partículas são alongadas e flexuosas com cerca de 650 nm de comprimento. Seu genoma é constituído de um RNA de fita simples (ssRNA) com 8,3 kb, poliadenilado no terminal 3'. A replicação do CoLV é mediada por uma RNA polimerase viral sem intermediários de DNA, e ocorre exclusivamente no citoplasma das células infectadas. A estratégia de expressão de suas proteínas próximas ao terminal 3' (CP de 38 kDa e proteína de 11 kDa) é baseada na síntese de RNAs subgenômicos de 1,3 e 2,6 kb (que não são encapsidados), (BELINTANI & GASPAR, 2002; MELLO *et al.*, 1987; COSTA *et al.*, 1974; KITAJIMA *et al.*, 1970). Embora o CoLV seja considerado uma espécie definitiva do gênero *Carlavirus*, ainda se desconhece a sequência completa do genoma desse vírus.

Há também pouca informação sobre a epidemiologia do CoLV e não se conhecem as estirpes e tampouco a variabilidade genética dessa espécie de vírus que ocorre exclusivamente no Brasil. São desconhecidas também as relações de sinergismo ou antagonismo das co-infecções do CoLV com outros vírus, principalmente com o TuMV. Dos trabalhos publicados envolvendo estudos sobre o CoLV podem ser citados: (i) o primeiro relato de CoLV em variedades de couve e estudos de seus aspectos ultraestruturais (KITAJIMA *et al.*, 1970); (ii) evidências de que o CoLV é uma espécie distinta do gênero *Carlavirus* (BELINTANI *et al.*, 2002); (iii) estudos moleculares evidenciando, experimentalmente, que as partículas de CoLV não se acumulam nos cloroplastos de *Chenopodium quinoa* (BELINTANI & GASPAR, 2003); e (iv) o primeiro relato de CoLV em raiz-forte (EIRAS *et al.*, 2008).

Considerando a importância econômica do cultivo de brássicas no Brasil e sua vulnerabilidade a infecções virais no campo, faz-se necessário o aprimoramento das técnicas de detecção associadas ao manejo da cultura para que se obtenha um controle efetivo das viroses, principalmente para agricultura familiar, que é carente de informações. A correta identificação dos vírus, de suas populações, da ocorrência de mutações e recombinações (variabilidade genética) associadas à sua capacidade de quebra de resistência podem fornecer subsídios para a adoção de estratégias de manejo e, conseqüentemente, controle (TOMLINSON, 1987; MITUTI, 2009; SALAS *et al.*, 2010; HULL, 2014).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos: (i) Identificar e caracterizar por técnicas moleculares, isolados brasileiros de carlavírus que infectam brássicas provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil, pelo sequenciamento de porções genômicas correspondentes ao terminal 3' do RNA viral (ORF 5, ORF 6 e terminal 3' não traduzido); (ii) Analisar a variabilidade genética, de dois isolados virais, o CoLV de SP e o AL, pelo

sequenciamento completo do genoma; (iii) Identificar por PCR e RT-PCR as espécies virais em infecções simples ou em coinfeções, presentes em brássicas, provenientes de diferentes Estados do Brasil; (iv) Avaliar o comportamento de variedades comerciais de brássicas frente à infecção experimental com dois isolados de CoLV provenientes de *B. oleracea* var. *acephala*;

2. Revisão de literatura

2.1. Origem, importância econômica e social das hortaliças

Registros indicam que a produção agrícola no Brasil teve início com a chegada dos portugueses, por volta de 1530, quando diversas espécies de plantas foram trazidas da Europa, incluindo hortaliças como as brássicas (couve, repolho, nabo, mostarda). Com a intensificação da imigração portuguesa, a partir do século XVIII, e o crescimento dos polos urbanos, houve incremento da produção de hortaliças, ocasionando mudanças nos hábitos alimentares dos brasileiros (CAMARGO FILHO & CAMARGO, 2010). Após o fim da Segunda Guerra Mundial, com o advento da Revolução Verde diversas transformações ocorreram na agricultura, principalmente no que se refere à utilização de agroquímicos para o controle de pragas e doenças. Nos anos 1960, no Brasil, a Revolução Verde, associada à Reforma Agrária impulsionaram o desenvolvimento agrícola nacional promovendo a solução de alguns problemas políticos, sociais e econômicos do campo (PICOLOTTO, 2014; NUNES, 2017). Nos anos 1970, Organizações Não Governamentais (ONGs) surgiram e promoveram questionamentos sobre o “modelo de desenvolvimento agrícola”.

Com isso, mudanças também ocorreram com relação à visão do meio rural e os modelos e princípios da agricultura familiar¹ passaram a ser reconhecidos. Nas décadas de 1980 e 1990, mudanças no enfoque das pesquisas realizadas na área agrícola, incluindo aspectos socioeconômicos, capacidade produtiva e análises da realidade e diversidade dos pequenos agricultores comprovaram a importância da agricultura familiar para o desenvolvimento do país (PICOLOTO, 2014; NUNES, 2017; SILVA & JESUS, 2017; DELGADO & BERGAMASCO, 2017). Documentos emitidos pela Organização das Nações

¹ Lei n11.326, de 24 de julho de 2006 (Artº3) estabelece agricultura familiar aqueles que: (i) não detenham, a qualquer título, área maior que 4 (quatro) módulos fiscais; (ii) utilizem predominantemente mão-de-obra da própria família nas atividades econômicas do seu estabelecimento ou empreendimento; (iii) tenham percentual mínimo da renda familiar originada de atividades econômicas do seu estabelecimento ou empreendimento, na forma definida pelo poder Executivo; (iv) dirijam seu estabelecimento ou empreendimento com sua família. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111326.htm.

Unidas (ONU) revelaram que, no Brasil, a agricultura familiar representava em 2015, 84% das propriedades rurais e contribuía com uma produção de cerca de 70% do total dos alimentos consumidos no mercado interno. Projeções também indicaram que a produção de alimentos produzidos a partir do sistema de agricultura familiar, sustentada pelo princípio de uma produção sustentável e dentro das normas de segurança alimentar, teria a capacidade para erradicar a fome mundial (PORTAL BRASIL, 2015).

Em 2015 e 2016, o Plano Safra recebeu um investimento recorde de R\$ 28,9 bilhões, feito pelo Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (Pronaf). Com estes investimentos foi possível atrair novas gerações, com conceitos mais tecnificados e modernos para o campo da agricultura familiar. Assim, a agricultura familiar no Brasil é reponsável pela produção de 70% do feijão, 87% da mandioca, 46% do milho, 38% do café, 34% do arroz e 21% do trigo (PORTAL BRASIL, 2015; SECRETARIA ESPECIAL DA AGRICULTURA FAMILIAR E DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO, 2016).

Os pequenos produtores rurais² também contribuem produzindo uma grande parte de espécies de plantas do segmento da olericultura . Essa produção corresponde a 21,46% do PIB brasileiro, o que totaliza um rendimento de cerca de R\$ 1,2 bilhões (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2016). Apesar da recente crise hídrica (2015-2016), o Brasil continua em constante expansão na produção de olerícolas e ocupa a décima posição entre os principais países produtores desse segmento (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS, 2016). A produção de olerícolas gera, em condição de campo aberto, um lucro maior do que outros segmentos da agricultura, sendo que a estimativa de renda gerada varia de US\$ 2 mil a 20 mil por hectare. Além disso, cada hectare cultivado pode gerar de 3 a 6 empregos diretos e indiretos, pois as plantações de olerícolas demandam mão de obra em todas as fases do cultivo e em diversos elos da cadeia produtiva (VILELA & HENZ, 2000).

A produção de brássicas tem destaque na agricultura nacional. Levantamentos realizados nas Centrais de Abastecimentos Estaduais (CEASA) distribuídas por todo o território nacional, revelaram que foram comercializadas cerca de 200.000 toneladas das mais variadas espécies e variedades de brássicas, movimentando mais de 240 milhões de reais (CONAB, 2014).

²Lei nº11.428, de 22 de dezembro de 2006 (Art 3º) considera pequeno produtor rural: aquele que residindo na zona rural, detenha a posse de gleba rural não superior a 50 (cinquenta) hectares, explorando-a mediante o trabalho pessoal e de sua família, admitida a ajuda de terceiros, bem como as posses coletivas de terra considerando-se a fração individual não superior a 50 (cinquenta) hectares, cuja renda bruta seja proveniente de atividades ou usos agrícolas, pecuários, silvicultura ou extrativismo rural em 80% (oitenta por cento) no mínimo. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11428.htm.

Com relação ao gênero *Brassica*, as espécies e variedades mais cultivadas são: couve-brócolo ou brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), couve-de-bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*), couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *Pekinensis*), couve-de-folha (*B. oleracea* var. *acephala*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), couve-rábano (*B. oleracea* var. *gongylodes*), couve-tronchuda (*B. oleracea* var. *tronchuda*), mostarda-de-folha (*B. juncea*), nabo (*B. rapa*) e repolho (*B. oleracea* var. *capitata*). Além do gênero *Brassica*, destacam-se outras Brassicaceae como o rabanete e o rábano (*Raphanus sativus*), a rúcula (*Eruca sativa*) e o agrião (*Nasturtium officinale*) (AGRIANUAL, 2013).

Considerando apenas o Estado de São Paulo, de 2012 a 2016, o volume comercializado de variedades de couve foi de mais de 85.000 toneladas, movimentando cerca de 200 milhões de reais (AGRIANUAL, 2017). No Distrito Federal, em 2013, a área de produção de 70 espécies de olerícolas chegou a 8.505,92 hectares, distribuídos entre 4.500 produtores, sendo 80% provenientes da agricultura familiar. O volume comercializado foi de 248.599,80 toneladas, arrecadando cerca de 185 milhões (EMBRAPA HORTALIÇAS, BRASÍLIA, DF, 2017). Com relação aos outros Estados da Federação não há informações atualizadas sobre o volume total comercializado, valores arrecadados e volume produzido. Há dificuldade para a obtenção de dados atualizados sobre a produção de brássicas (e demais hortaliças) no Brasil, pois são produtos perecíveis e de comercialização rápida (de consumo imediato). Seu comércio é realizado pelos agricultores familiares em feiras livres, venda direta nos campos de produção, venda direta para estabelecimentos comerciais próximos às áreas de cultivo (supermercados, mercearias, hortifrutigranjeiros) e venda para centrais de abastecimento (PICOLOTTO, 2014; NUNES, 2017). Vale ressaltar que os dados estatísticos de produção, área plantada, área colhida, comercialização de insumos e demais parâmetros de produção são de extrema importância para as avaliações do impacto da atividade agrícola na economia nacional, fundamental para subsidiar políticas públicas, auxiliar na tomada de decisões e planejamento dos órgãos e instituições governamentais. Esses dados básicos também servem de suporte e direcionamento para pesquisas científicas, ações de extensão rural, avaliações e intervenções socioeconômicas, além de dar condições de participação de entidades privadas e ONGs (IGNÁCIO, 2010).

Portanto, em função da importância das olerícolas no Brasil, é importante avaliar uma série de aspectos para garantir a produção, envolvendo desde o manejo consciente e adequado da cultura, visando ao controle de pragas e doenças de modo integrado e sustentável até a sua comercialização com estudos de doenças de pós-colheita, promovendo a difusão e o acesso

dessas informações para o segmento da agricultura familiar que ainda é desguarnecida de assistência técnica efetiva (IGNÁCIO, 2010; DELGADO & BERGAMASCO, 2017).

2.2. Brássicas: origem, classificação e características

As brássicas pertencem à família Brassicaceae, anteriormente denominada Cruciferae, devido ao fato de suas flores possuírem formato de cruz. Considerada uma das maiores famílias botânicas, com cerca de 400 gêneros que abrigam mais de 4000 espécies. As brássicas tem origem atribuída à costa norte do Mediterrâneo e Ásia. Posteriormente, sua dispersão ocorreu para todo o continente europeu e, subseqüentemente, para os demais continentes, tornando-se parte importante da alimentação humana. No Brasil, são registradas cerca de 50 espécies nativas e introduzidas distribuídas em 10 gêneros (SOUZA & LORENZI, 2008; BRIGHENTI & OLIVEIRA, 2011).

Em sua grande maioria, possuem porte herbáceo com ciclos perenes ou anuais. As folhas são alternas, simples ou compostas e suas flores, hermafroditas, apresentam pétalas em formato de cruz se agrupam em inflorescências formando cachos ou corimbos. Sépalas e pétalas alternam-se e possuem seis estames. Possuem ovário súpero sobre um ginóforo com dois carpelos que, após a polinização, dão origem a um fruto denominado síliqua (SOUZA & LORENZI, 2008).

Uma forma de demonstrar a evolução do gênero *Brassica* é através do “Triângulo de U” (*Triangle of U*) (NAGAHARU, 1935), que constitui a base evolutiva de três ancestrais comuns diploides: *B. rapa*, *B. nigra* e *B. oleracea* que, por hibridação interespecífica, originaram as espécies tetraploides: *B. carinata*, *B. juncea* e *B. napus*. Apesar de serem espécies distintas, estão intimamente relacionadas, apresentando compatibilidade genética, que permitiu os cruzamentos interespecíficos. Essas plantas híbridas são alotetraploides, pois possuem 4 genomas derivados de duas espécies ancestrais distintas (Figura 1).

Com o avanço da ciência, foi possível obter variedades de brássicas por meio do melhoramento genético da espécie principal, *B. oleracea*. Dentre as variedades obtidas, destacam-se: couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*), couve-de-Bruxelas, brócolis, couve-flor e repolho. Além destas, há outras espécies de brássicas cultivadas que também merecem destaque: as mostardas (*B. nigra* e *Sinapis* spp.), a canola (*B. napus*), o rabanete, o agrião, a rúcula, a couve-chinesa, o nabo e a raiz-forte. Algumas brássicas consideradas plantas daninhas: nabiça (*Raphanus raphanistrum*), mostardas-do-campo (*Brassica rapa*,

Rapistrum rugosum e *Sinapis arvensis*), mentruz (*Lepidium* spp.), agrião-bravo (*Cardamine bonariensis*) e a bolsa-de-pastor (*Capsella bursa-pastoris*) (SOUZA & LORENZI, 2008).

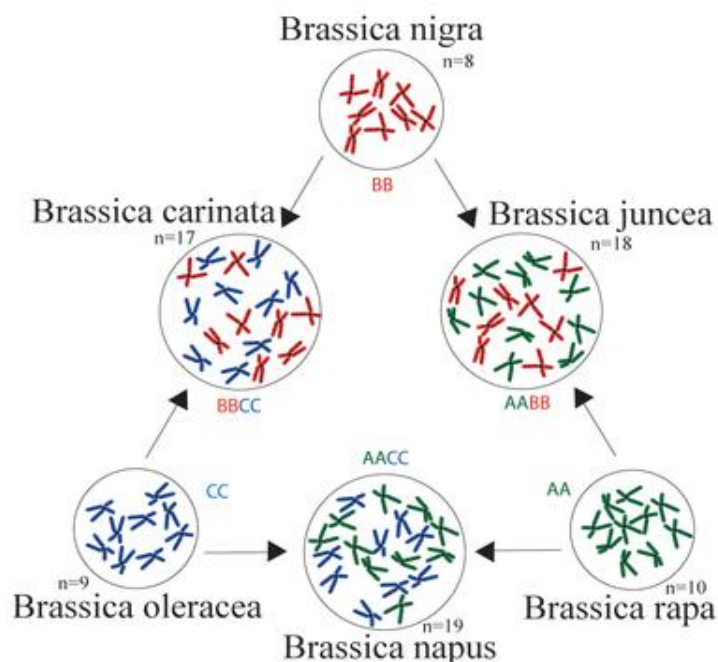


Figura 1: Esquema do “Triângulo de U” (NAGAHARU, 1935) com a representação das relações genéticas entre as seis espécies do gênero *Brassica* (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. nigra*, *B. napus*, *B. juncea* e *B. carinata*) e o número de cromossomos de cada genoma A, B e C e as respectivas hibridações (Figura retirada da internet: *Wikipedia, the free encyclopedia*).

2.3. Viroses em brássicas e influência das plantas de vegetação espontânea

Diversos fatores influenciam a qualidade e o rendimento da produção das brássicas cultivadas. Aspectos sazonais, variações climáticas, deficiência nutricional (solos pobres ou manejo nutricional inadequado), cultivos constantes de uma mesma espécie na mesma área (monocultura), uso excessivo de agroquímicos e escassez de água e fatores bióticos são responsáveis por danos e quebras da produção. As (insetos e ácaros) e, principalmente, as doenças de origem bacteriana (bactérias e fitoplasmas), fúngica e viral são responsáveis por danos e perdas nos cultivos de brássicas. Entre os vírus já descritos em brássicas no mundo (Tabela 1), destacam-se o CaMV e o TuMV, pois causam danos e consequentes prejuízos aos agricultores (SHATTUCK, 1992). No Brasil, o TuMV foi relatado infectando couve-chinesa no Estado de São Paulo com incidência acima de 60% e causando perdas econômicas (RODRIGUES *et al.*, 2015). Colariccio *et al.* (2000) já alertavam sobre a importância desse vírus na produção de couve-chinesa nos Estados de São Paulo e Minas Gerais.

O CoLV, único carlavírus descrito infectando brássicas, foi relatado exclusivamente no Brasil em espécies de brássicas cultivadas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Distrito Federal (COSTA *et al.*, 1972; MELLO *et al.*, 1987 BELINTANI *et al.*, 2002; EIRAS *et al.*, 2008). Aspectos epidemiológicos como a transmissão por afídeos e o papel das plantas da vegetação espontânea, bem como a sua importância nos cultivos de brássicas ainda são desconhecidos. Em levantamentos realizados recentemente em áreas produtoras de hortaliças, o CoLV foi detectado em plantas de couve, induzindo sintomas de clareamento de nervuras e mosaico ou, em alguns casos, latência, sendo sua incidência maior do que até então se imaginava (EIRAS, M., comunicação pessoal).

Tabela 1: Vírus que infectam brássicas no Brasil e no mundo.

Vírus	Gênero	Família
Turnip yellows virus – TuYV (“amarelo do nabo”)	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>
Cucumber mosaic virus – CMV (“mosaico do pepino”)	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
Radish mosaic virus – RaMV (“mosaico do rabanete”)	<i>Comovirus</i>	<i>Secoviridae</i>
Ribgrass mosaic virus – RMV (“mosaico do plantago”)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>
Turnip crinkle virus – TCV (“encrespamento do nabo”)	<i>Betacarmovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
Turnip yellow mosaic virus – TYMV (“mosaico amarelo do nabo”)	<i>Tymovirus</i>	<i>Tymoviridae</i>
Cole latent virus – CoLV (“vírus latente da couve”)	<i>Carlavirus</i>	<i>Betaflexiviridae</i>
Cauliflower mosaic virus – CaMV (“mosaico da couve-flor”)	<i>Caulimovirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>
Turnip mosaic virus – TuMV (“mosaico do nabo”)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>

Em negrito, vírus que já foram descritos no Brasil infectando brássicas (SHATTUCK, 1992; BELINTANI *et al.*, 2002; STEVENS *et al.*, 2008).

Os vírus que infectam brássicas podem induzir sintomas diversos nas plantas hospedeiras como deformação foliar, anéis cloróticos e necróticos, clareamento de nervuras, mosaico e necrose generalizada das folhas, além de nanismo e, em alguns casos, pode causar a morte da planta. Em algumas interações vírus-hospedeiro pode ocorrer latência, ou seja, o vírus se replica e infecta a planta sistemicamente, mas não há a indução de sintomas perceptíveis nem alteração significativa da produção. A latência é frequentemente observada em brássicas infectadas pelo CoLV que, de certa forma, por passar despercebido aos olhos dos agricultores, propicia a manutenção da fonte de inóculo do vírus no campo (LIN *et al.*,

1980; MELLO *et al.*, 1987; SANTOS *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003). Embora não haja expressão de sintomas, a infecção viral pode promover algum tipo de alteração no desenvolvimento da planta e também na qualidade de produção. Outro fator que deve ser considerado está relacionado às condições ambientais, principalmente a temperatura, que pode ter influência nas interações vírus-hospedeiro alterando a expressão de sintomas e quebra de resistência. No caso das olerícolas, os danos induzidos pelas infecções virais podem afetar a qualidade do produto final, principalmente em função dos sintomas que se manifestarem depreciando as folhas e impossibilitando a sua comercialização (FAJARDO *et al.*, 2001; FAYAD-ANDRÉ *et al.*, 2011; MITUTI, 2011).

No campo, a transmissão dos vírus por insetos vetores envolve, além da participação das plantas cultivadas, que podem ser hospedeiras dos vírus e, em alguns casos, também dos vetores, a interação dos vetores com outras espécies de plantas que compõem o agroecossistema (GALLET *et al.*, 2018). A frequência com que um vírus infecta uma planta hospedeira e se dispersa nas áreas cultivadas depende de fatores como tamanho e diversidade da população de plantas hospedeiras, área de distribuição, estratégias de defesa (constitutiva ou induzida) e atratividade entre hospedeira e vetor (GALLET *et al.*, 2018). As interações vírus-vetor-hospedeira estão associadas a fatores abióticos (elicitores: condições ambientais) e bióticos (indutores de origem microbiana: fitopatógenos) e podem ter papel determinante no sucesso da transmissão realizada pelo inseto vetor (ZHOU *et al.*, 2018). Entretanto, outros aspectos podem influenciar na epidemiologia dos vírus que infectam brássicas e estão relacionados com o papel das plantas da vegetação espontânea. Muitas espécies da vegetação espontânea, principalmente da família Brassicaceae [mostarda-selvagem (*B. juncea*), mentruz (*Coronopus didymus*), mastruz (*Lepidium virginicum*), nabiça, rabanete selvagem (*R. sativus*), mostarda-branca (*Sinapsis arvensis*), entre outras] e Solanaceae [joá-de-capote (*Nicandra physalodes*), camapu (*Physalis angulata*), *Solanum* spp., entre outras] crescem naturalmente nos campos de produção, e podem atuar como reservatório de vírus e de seus insetos vetores, e apresentam variabilidade genética elevada, resistência a fatores bióticos e abióticos, desenvolvimento rápido e ciclo curto, além de terem maior capacidade de se adaptar a diferentes tipos de clima e solo (BRIGHENTI & OLIVEIRA, 2011). Resultados de experimentos realizados recentemente sugerem que a nabiça, espécie encontrada infestando cultivos de brássicas, tem um papel importante na epidemiologia do TuMV (RODRIGUES, 2019). No entanto, poucos estudos foram realizados até o momento associando espécies de plantas da vegetação espontânea e seu papel como reservatórios de vírus e de insetos vetores. Para o CoLV, ainda não há trabalhos sobre os aspectos epidemiológicos envolvendo a

transmissão e possíveis plantas hospedeiras com potencial para atuar como reservatório do vírus no campo.

Diante desses entraves, a resistência genética ainda é a principal medida de controle adotada para os vírus de plantas (HULL, 2014). Porém, ainda há um número limitado de genes identificados que conferem algum tipo de resistência a doenças, e um número ainda menor de variedades comerciais resistentes a vírus. No caso de brássicas, há genes recessivos e dominantes já identificados, que conferem resistência ao TuMV: *retr01* (recessivo), *TurB01-05* (dominantes) (WALSH & JENNER, 2002; HULL, 2014; REVERS & NICAISE, 2014). Na ausência de variedades com esses genes, de uma maneira geral, algumas medidas preventivas de controle podem ser preconizadas, tais como: (i) eliminação de fontes de vírus (prevenção e erradicação de focos de infecção primária e secundária, utilização de mudas e sementes com certificação fitossanitária associada à rotação de culturas); (ii) monitoramento das populações de vetores (isolamento das plantas, utilização de armadilhas, controle químico, emprego de superfícies refletoras, óleos e repelentes); e (iii) manejo cultural (rotação de culturas e utilização de diferentes variedades) (TOMLINSON, 1987; MITUTI, 2009; PASQUAL *et al.*, 2010; HULL, 2014).

2.4. Cole latent virus: o “vírus latente da couve”

O CoLV pertence ao gênero *Carlavirus*, subfamília *Quinvirinae*, família *Betaflexiviridae*, ordem *Tymovirales*, Domínio *Riboviria* (ICTV, 2019, SIDDELL *et al.*, 2019). *Carnation latent virus* é a espécie tipo que dá nome ao gênero, pois foi descrita em plantas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.), espécie ornamental que não desenvolve sintomas foliares aparentes, mas pode apresentar perda do vigor que interfere na qualidade das flores. A família *Betaflexiviridae* é subdividida em duas subfamílias: *Quinvirinae* e *Trivirinae*. Essa subdivisão foi proposta após análises filogenéticas da porção genômica correspondente à replicase, que proporcionou a formação de dois ramos principais. Nessas duas subfamílias foram incluídos quatro novos gêneros, afim de acomodar espécies que ainda não haviam sido classificadas como pertencentes à *Betaflexiviridae*. A designação proposta para as subfamílias foi definida com base no número de genes conservados dos membros nelas contidos, sendo *Trivirinae* por possuir 3 regiões conservadas [replicase (1), proteína de movimento (1) e capa proteica (1)] e *Quinvirinae* por possuir 5 regiões conservadas [replicase (1), triplo bloco gênico (3) e capa proteica (1)]. Os critérios de classificação das espécies de *Betaflexiviridae* foram definidos com base nas sequências de nucleotídeos das fases de leitura abertas (*Open*

Reading Frame, ORF) que codificam a replicase (Rep) e a capa proteica (CP). Vírus de diferentes gêneros devem possuir menos de 45% de identidade de nucleotídeos nessas ORF. A diferenciação de espécies requer uma identidade de nucleotídeos menor que 72% e identidade de aminoácidos menor que 80%, quando comparadas às porções genômicas da Rep ou da CP. Das quase 100 espécies de vírus pertencentes à família *Betaflexiviridae*, mais de 50% (53 espécies) pertencem ao gênero *Carlavirus* (Tabelas 2 e 3).

As espécies de *Carlavirus* possuem partículas flexuosas alongadas com 610 a 700 nm de comprimento e 12 a 15 nm de diâmetro. O genoma desses vírus é constituído por um RNA linear de fita simples e senso positivo [(+)ssRNA] – corresponde ao grupo IV da classificação proposta por Baltimore (1971) –, com tamanhos entre 7,4-8,9 kb, que compreende seis ORF, cauda de poliadenilação [poly(A)] localizada na região 3' terminal e, em algumas espécies, estrutura cap na região 5' terminal. A **ORF 1** codifica uma proteína com função de replicase, que apresenta quatro domínios conservados: metiltransferase (Mt), protease do tipo papaína (*papain-like protease* - P-Pro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* - RdRp). As **ORFs 2, 3 e 4** formam o triplo bloco gênico (*Triple Gene Block*, TGB), que codificam proteínas relacionadas com o movimento do vírus célula a célula. A **ORF 5** codifica a CP e a **ORF 6** codifica uma proteína rica em cisteína com capacidade de ligação a ácidos nucleicos (*RNA-Binding Protein*, RBP), com atividade associada à supressão de silenciamento gênico. As ORFs da região 3' terminal são traduzidas a partir de dois RNAs subgenômicos (FOSTER, 1992; ADAMS *et al.*, 2004; GASPAR *et al.*, 2008; IGORI *et al.*, 2016; ZANARDO *et al.*, 2017).

Tabela 2: Número de espécies, subfamílias e gêneros aceitos pelo *International Committee on Taxonomy of Viroses* (ICTV) na Família *Betaflexiviridae*, Ordem *Tymovirales*, Domínio *Riboviria*

Domínio <i>Riboviria</i> / Ordem <i>Tymovirales</i> / Família <i>Betaflexiviridae</i>	
Subfamília	Gênero
<i>Quinvirinae</i>	<i>Carlavirus</i> (53 espécies)
	<i>Foveavirus</i> (5 espécies)
	<i>Robigovirus</i> (7 espécies)
	Não atribuído (3 espécies)*
<i>Trivirinae</i>	<i>Capilovirus</i> (4 espécies)
	<i>Chordovirus</i> (2 espécies)
	<i>Citrivirus</i> (1 espécie)
	<i>Divavirus</i> (3 espécies)
	<i>Prunavirus</i> (3 espécies)
	<i>Tepovirus</i> (2 espécies)
	<i>Trichovirus</i> (7 espécies)
	<i>Vitivirus</i> (15 espécies)
<i>Wamavirus</i> (1 espécie)	

Fonte: Página do ICTV na internet - <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (acesso em março de 2019);

*Correspondem a espécies virais que ainda não foram classificadas em gêneros da subfamília *Quinvirinae*.

Tabela 3: Espécies aceitas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) na subfamília *Quinvirinae* e gênero *Carlavirus*.

Domínio <i>Riboviria</i> / Ordem <i>Tymovirales</i> / Família <i>Betaflexiviridae</i>	
Subfamília <i>Quinvirinae</i>	
Gênero <i>Carlavirus</i>	
Espécies	Espécies
<i>Aconitum latent virus</i>	<i>Melon yellowing-associated virus</i>
<i>American hop latent virus</i>	<i>Mirabilis jalapa mottle virus</i>
<i>Atractylodes mottle virus</i>	<i>Narcissus commom latent virus</i>
<i>Blueberry scorch virus</i>	<i>Nerine latent virus</i>
<i>Butterbur mosaic virus</i>	<i>Passiflora latent virus</i>
<i>Cactus virus 2</i>	<i>Pea streak virus</i>
<i>Caper latent virus</i>	<i>Phlox virus B</i>
* <i>Carnation latent virus</i>	<i>Phlox virus M</i>
<i>Chrysanthemum virus B</i>	<i>Phlox virus S</i>
<i>Cole latent virus</i>	<i>Poplar mosaic virus</i>
<i>Coleus vein necrosis virus</i>	<i>Potato latent virus</i>
<i>Cowpea mild mottle virus</i>	<i>Potato virus H</i>
<i>Cucumber vein-clearing virus</i>	<i>Potato virus M</i>
<i>Daphne virus S</i>	<i>Potato virus P</i>
<i>Gaillardia latent virus</i>	<i>Potato virus S</i>
<i>Garlic commom latent virus</i>	<i>Red clover vein mosaic virus</i>
<i>Helenium virus S</i>	<i>Sambucus virus C</i>
<i>Helleborus mosaic virus</i>	<i>Sambucus virus D</i>
<i>Helleborus net necrosis virus</i>	<i>Sambucus virus E</i>
<i>Hippeastrum latent virus</i>	<i>Shallot latent virus</i>
<i>Hop latent virus</i>	<i>Sint-Jan onion latent virus</i>
<i>Hop mosaic virus</i>	<i>Strawberry pseudo mild yellow edge virus</i>
<i>Hydrangea chlorotic mottle virus</i>	<i>Sweet potato C6 virus</i>
<i>Kalanchoe latent virus</i>	<i>Sweet potato chlorotic fleck virus</i>
<i>Ligustrum necrotic ringspot virus</i>	<i>Verbena latent virus</i>
<i>Ligustrum virus A</i>	<i>Yam latent virus</i>
<i>Lily symptomless virus</i>	

**Carnation latent virus*: espécie tipo do gênero *Carlavirus*. Fonte: ICTV na internet - <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (acesso em março de 2019).

A organização genômica das espécies pertencentes ao gênero *Carlavirus*, quando comparada com os outros gêneros da subfamília *Quinvirinae*, apresenta certo grau de similaridade, porém os carlavírus possuem seis ORFs, enquanto os outros gêneros dessa subfamília apresentam somente 5 ORF, pois não possuem a ORF 6, que codifica uma proteína de 11 kDa (ADAMS *et al.*, 2004) (Figura 2).

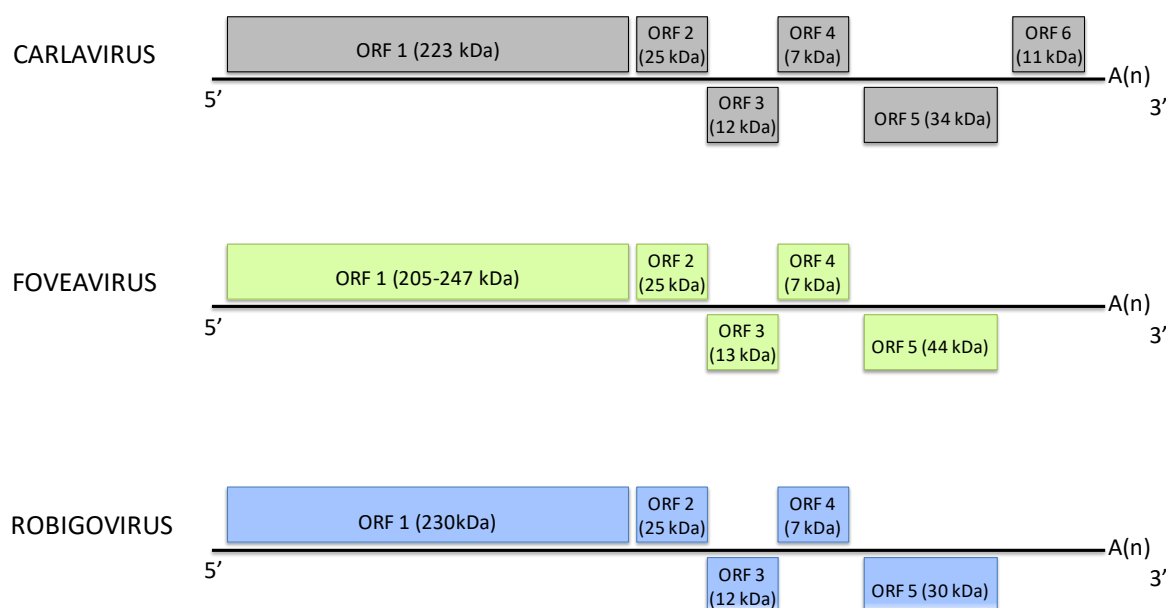


Figura 2: Organizações genômicas dos três gêneros pertencentes à subfamília *Quinvirinae*: *Carlavirus*, *Foveavirus* e *Robigovirus*. A ORF 1 codifica a replicase viral, as ORFs 2, 3 e 4 formam o *Triple Gene Block* (TGB) que codificam proteínas associadas ao movimento do vírus célula a célula, a ORF 5 codifica a capa proteica (CP) viral e a ORF 6, presente somente nas espécies do gênero *Carlavirus*, codifica uma proteína (11 kDa) rica em cisteína associada à supressão de silenciamento gênico. Figura adaptada de Adams *et al.* (2004).

Estudos revelaram que as partículas virais de espécies de *Carlavirus* normalmente estão confinadas ao citoplasma das células da epiderme e do mesófilo e, com menor frequência, podem ser detectadas no floema e xilema e, raramente, nos plasmodesmas (JEYANANDARAJAH & BRUNT, 1993). A transmissão dos carlavírus é feita na natureza através de espécies de afídeos de maneira não circulativa, não persistente, com exceção do cowpea mild mottle virus (CPMMV) e do melon yellowing-associated virus (MYaV), que são transmitidos por moscas brancas (JEYANANDARAJAH & BRUNT, 1993; NAGATA *et al.*, 2005). No caso específico do MYaV, sua transmissão é realizada apenas por enxertia ou através do inseto vetor, não sendo possível a sua transmissão mecanicamente (ÁVILA *et al.*, 2008; ZANARDO *et al.*, 2017).

Dos carlavírus descritos no mundo, sete foram relatados no Brasil em diferentes espécies de plantas cultivadas: garlic common latent virus (GarCLV) em alho (*Allium sativum*) nos Estados da Bahia (BA), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e São Paulo (SP); shallot latent virus (SLV) em alho nos Estados de SP e PR; melon yellowing-associated virus (MYaV) identificado nos Estados do Rio Grande do Norte (RN), Pernambuco (PE) e BA em cultivos de melão (*Cucumis melo*); cowpea mild mottle virus (CPMMV) em cultivos de soja (*Glycine max*) nos Estados da Bahia, Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Maranhão (MA), MG, PR, Pará (PA) e SP, além de ter sido detectado em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) nos Estados de SP e PR; potato virus M (PVM) em batata (*Solanum tuberosum*) no Estado do RS; sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV) em batata-doce (*Ipomea batatas*); cole latent virus (CoLV) em raiz-forte no Estado de SP e em couve-flor, brócolis, couve, nabo (*B. rapa*) e couve-chinesa nos Estados de MG, DF e SP (KITAJIMA *et al.*, 1970; DANIELS *et al.*, 1978; LIN *et al.*, 1979; COSTA *et al.*, 1983; DUSI *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003; EIRAS *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009).

Outra possível espécie de *Carlavirus*, identificada em fedegoso (*Cassia macranthera* DC) e ponçada (*Cassia sylvestris* Wilkstrom), respectivamente, nos Estados do PR e SP, foi denominada Cassia mild mosaic virus (CasMMoV) (SEABRA *et al.*, 2001). Em 2016, porém, uma porção do genoma (replicase) do CasMMoV foi sequenciada (código de acesso no GenBank: GU481094), indicando que essa espécie pertencia ao gênero *Allexivirus* (família *Alphaflexiviridae*, ordem *Tymovirales*) (BESERRA *et al.*, 2011). Porém, até o momento essa proposta não foi aceita pelo ICTV. Outros possíveis carlavírus também foram identificados em cebolinha (*Allium ascalonicum*), alstroeméria (*Alstroemeria* sp.) e em seringueira (*Hevea brasiliensis*). No entanto, a correta identidade desses vírus ainda precisa ser confirmada (GAMA *et al.*, 1983; COLARICCIO *et al.*, 1996).

O primeiro relato de CoLV foi realizado em plantas de couve no Estado de São Paulo em couve (KITAJIMA *et al.*, 1970). Estes autores ao realizarem investigações com relação à suscetibilidade de diferentes variedades de couve ao TuMV, constataram a presença de um vírus que, quando isolado do TuMV e inoculado em plantas de couve, não induzia sintomas, sendo então denominado “vírus latente da couve”. Além de ser latente, foi observado que era transmitido mecanicamente e também por afídeos. As observações realizadas ao microscópio eletrônico de transmissão por meio de contrastação negativa e preparações de cortes ultrafinos permitiram observar partículas alongadas flexuosas com cerca de 650 nm e inclusões citoplasmáticas formando agregados de partículas, típicas de carlavírus. Naquela ocasião, o

vírus foi classificado como pertencente ao grupo do “vírus S da batata” (potato virus S, PVS). Posteriormente, porém, esse vírus foi identificado como sendo uma nova espécie de carlavírus e denominado *Cole latent virus* (BELINTANI *et al.*, 2002). Mais recentemente, isolados de CoLV foram identificados em amostras de raiz-forte provenientes do município de Divinolândia, SP. As plantas exibiam mosaico e anéis cloróticos. No entanto, constatou-se que muitas amostras estavam coinfetadas com o TuMV, o que não possibilitou concluir o efeito dos isolados do CoLV em plantas de raiz-forte (EIRAS *et al.*, 2008).

O CoLV, assim como observado em outros carlavírus, raramente induz sintomas visíveis em suas hospedeiras. Sua morfologia e organização genômica não diferem das outras espécies de carlavírus, e sua replicação é realizada como um típico vírus de (+)ssRNA, mediada por uma RNA polimerase viral, sem intermediários de DNA. A estratégia de expressão de suas proteínas da região 3' terminal (CP de 38 kDa e proteína de 11 kDa) é baseada na síntese de RNAs subgenômicos de 1,3 e 2,6 kb (que não são encapsidados) (Figura 3) e ocorre exclusivamente no citoplasma das células hospedeiras (BELINTANI *et al.*, 2002; BELINTANI & GASPAR, 2003; ADAMS *et al.*, 2004). Além disso, a gama de hospedeiros experimentais do CoLV parece estar restrita a pouquíssimas espécies, tais como: *Gomphrena globosa*, *Chenopodium giganteum*, *C. quinoa*, *Malva parviflora*, *B. oleracea* var. *acephala*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *Raphanus sativus*, *Citrullus lanatus*, *Glycine max*, *Solanum melongena* e *Phaseolus vulgaris* (COSTA *et al.*, 1980; BRUNT *et al.*, 1997). Até o presente momento, há pouco conhecimento sobre o comportamento e epidemiologia do CoLV nos cultivos de brássicas e, além disso, não se conhecem as populações e a variabilidade genética desse vírus no Brasil.

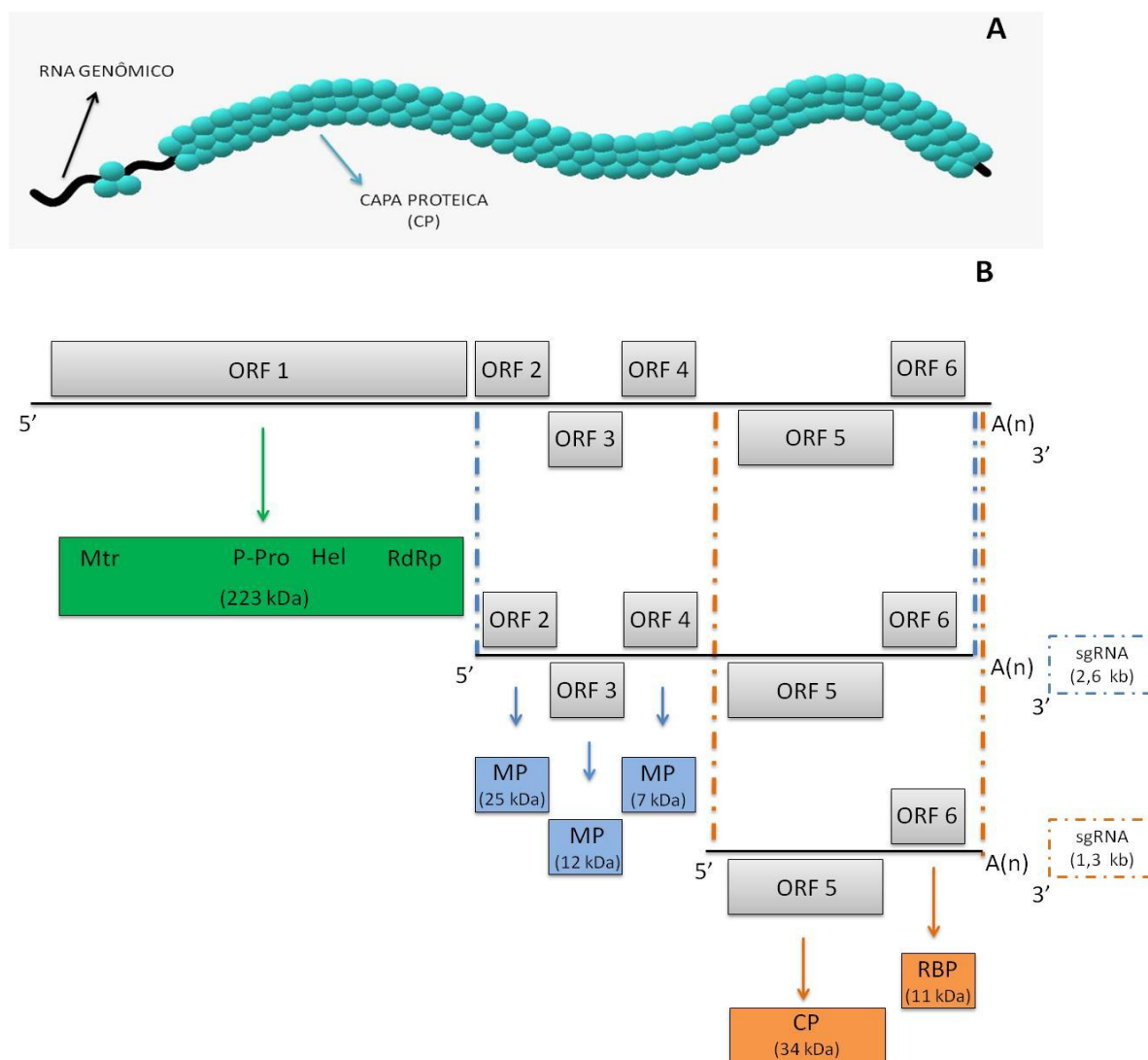


Figura 3: Esquemas da morfologia, organização genômica e expressão das proteínas das espécies do gênero *Carlavirus*. (A) Partícula flexuosa alongada com 610-700 nm de comprimento e 12-15 nm de diâmetro, com a representação das subunidades da proteína da capa (CP), em azul, envolvendo a fita simples de RNA; (B) Esquema da organização genômica dos carlavírus, indicando a posição de cada ORF e localização dos RNAs subgenômicos: **ORF 1** codifica a replicase viral, proteína com 223 kDa com quatro domínios: metiltransferase (Mtr), *papain-like protease* (P-Pro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); **ORFs 2, 3 e 4** formam o triplo bloco gênico (*Triple Gene Block*, TGB) que codificam proteínas associadas ao movimento do vírus célula a célula (MP); **ORF 5** codifica a capa proteica (CP) do vírus; e **ORF 6** codifica uma proteína rica em cisteína (*RNA-Binding Protein*, RBP), com atividade associada à supressão de silenciamento gênico. As ORFs do terminal 3' são traduzidas por dois RNAs subgenômicos, sgRNA (que não são encapsidados) de 1,3 kb e 2,6 kb.

2.5. Aspectos relacionados à transmissão do CoLV

Os vírus de plantas são parasitas obrigatórios, pois dependem exclusivamente das células vivas e de fatores da planta hospedeira para completar seu ciclo infeccioso, que inclui: perda da capa proteica (desencapsidação, que ocorre após a sua entrada na célula), tradução das proteínas virais, replicação e acúmulo dos ácidos nucleicos virais, movimento a curtas

distâncias, célula a célula (via plasmodesmas) e a longas distâncias (via floema), montagem das partículas virais e transmissão (HULL, 2014; NICAISE, 2017; EIRAS *et al.*, 2018). Os vírus de plantas precisam ser introduzidos no interior da célula vegetal, que pode ocorrer natural ou experimentalmente de forma mecânica ou através de vetores, por exemplo, os insetos. Além disso, a disseminação do vírus também pode ser realizada por enxertia, pólen, órgãos de propagação vegetativa e sementes (HULL, 2014). Para que haja o início do(s) processo(s) infeccioso(s), porém, os vírus necessitam ter acesso à célula hospedeira. A penetração do(s) vírus nas células vegetais é realizada de “forma passiva”, uma vez que as plantas possuem barreiras (cutícula e parede celular) que os vírus não conseguem ultrapassar, diferentemente dos vírus que infectam animais que reconhecem receptores específicos localizados na membrana celular, e de bactérias e fungos fitopatogênicos que produzem enzimas capazes de degradar componentes dessas barreiras (principalmente lignina e celulose) (HULL, 2014). Os vírus de plantas precisam ser introduzidos no interior da célula vegetal, que pode ocorrer mecanicamente de forma experimental, natural (insetos vetores) ou por instrumentos de corte contaminados. No caso específico do CoLV, como na maioria dos carlavírus, principalmente por serem vírus que infectam e se acumulam nas células da epiderme e do mesófilo, o vírus pode ser transmitido mecanicamente com facilidade, por meio da fricção de extrato de folha infectada sobre folhas de plantas saudáveis. Os demais vírus de brássicas que ocorrem no Brasil, TuMV e CaMV, também infectam e se acumulam nas células da epiderme e do mesófilo, e são transmitidos mecanicamente. Porém, no campo, a transmissão que tem maior relevância epidemiológica é realizada por diversas espécies de afídeos vetores, que transmitem os três vírus de brássicas (BRAGARD *et al.*, 2013; HULL, 2014).

A eficiência na transmissão é caracterizada pela especificidade entre o vetor e o vírus, sendo que a aquisição do vírus pelo vetor, a ligação e a retenção dos vírus nos sítios de ligação no vetor influenciam diretamente no sucesso da transmissão (DÁDER *et al.*, 2017). As interações entre vírus e vetores da ordem Hemiptera, principalmente os afídeos, têm sido amplamente estudadas, pois 42% dos vírus conhecidos são transmitidos por insetos dessa ordem (HULL, 2014).

A transmissão de vírus por vetores ocorre em duas categorias principais: **(i) não circulativa**, subdividida nos modos não-persistente e semipersistente; e **(ii) circulativa**, que pode ser propagativa e não-propagativa (BRAGARD *et al.*, 2013; WHITFIELD *et al.*, 2015; DÁDER *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018). Os afídeos são os únicos vetores capazes de transmitir vírus em todas essas categorias, tanto de maneira circulativa como não circulativa,

sendo que cada espécie de vírus apresenta um único tipo de vetor e um único modo de transmissão (exceção aos vírus classificados como bimodais como, por exemplo, o CaMV) (BRAGARD *et al.*, 2013). Os vírus que são transmitidos por vetores são dependentes do hábito de alimentação do vetor. Portanto, o entendimento da transmissão de vírus por vetores depende do conhecimento dos aspectos envolvidos na alimentação do seu vetor (HULL, 2014).

O modo de transmissão não circulativo se caracteriza pela retenção do vírion na porção anterior do aparelho bucal (estiletes), pré-cibário ou cibário dos afídeos vetores (WHITFIELD *et al.*, 2015). O vírus não circula no corpo do vetor e não havendo o período de latência (período que o vírus, após a sua aquisição pelo vetor, não será transmitido). Assim, o vetor perderá rapidamente a capacidade de transmitir o vírus, sendo este período menor no modo de transmissão não circulativo. O vírus, portanto, não persiste no vetor. Outra característica importante é que, após o inseto passar pela troca do exoesqueleto (ecdise), as partículas virais são perdidas e o inseto, portanto, deixa de ser virulífero. O modo de transmissão não circulativo é sub-dividido em: **(i) não persistente**, quando os afídeos adquirem as partículas virais em questão de segundos ou minutos (aquisição), durante as picadas de prova realizadas em uma planta infectada, sendo capazes de transmiti-las também em questão de minutos ou segundos ao realizar novas picadas de prova em uma planta sadia (inoculação) (exemplos: TuMV ou CoLV); e **(ii) semi-persistente**, quando as partículas virais persistem no afídeo por um período mais prolongado (horas), sendo que o tempo de aquisição e de inoculação do vírus pode levar de minutos a algumas horas. Este modo de transmissão, em geral, é observado em vírus associados ao floema como, por exemplo, o citrus tristeza virus (CTV) (HULL, 2014; EIGENBRODE *et al.*, 2018). O CaMV, embora não seja um vírus restrito ao floema, é transmitido de modo semi-persistente e, em algumas situações, também pode ser transmitido de modo não persistente, sendo denominado vírus de transmissão bimodal (BRAGARD *et al.*, 2013; WHITFIELD *et al.*, 2015).

No modo de transmissão não circulativo não persistente são reconhecidas duas estratégias básicas que envolvem as íntimas interações vírus-vetor: **(i)** ligação direta da proteína capsial (CP); e **(ii)** utilização de um ou mais componentes auxiliares (*Helper Component*, HC) (BRAGARD *et al.*, 2013; HULL, 2014; VALLI *et al.*, 2018). Recentemente, identificou-se uma proteína (Stylin-1) localizada na extremidade anterior do estilete de algumas espécies de afídeos, que corresponde ao primeiro receptor associado às ligações de vírus transmitidos de modo não circulativo (WEBSTER *et al.*, 2018).

O TuMV, assim como os demais potyvírus, utilizam a HC-Pro, uma proteína não estrutural multifuncional codificada pelo vírus, que media a ligação entre o vírion e a parede do estilete do afídeo (VALLI *et al.*, 2018). O CaMV, por sua vez, codifica duas proteínas auxiliares associadas à transmissão: a P2, que possui afinidade a um receptor localizado no duto comum nas extremidades dos estiletos maxilares do afídeo; e a P3 denominada de fator de transmissibilidade, formado por três monômeros que ficam ancorados no capsídeo, formando uma espécie de corpo de inclusão (BRAGARD *et al.*, 2013).

Vale ressaltar também que nas interações vírus-vetor, além dos aspectos envolvidos efetivamente na transmissão do vírus, outros fatores devem ser levados em consideração. A saliva do inseto vetor, por exemplo, possui componentes que podem ativar o sistema de defesa da planta, apresentando um papel relevante na infecção viral (GALLO *et al.*, 2002). Outro aspecto observado em alguns patossistemas está relacionado à maior atratividade de insetos vetores a plantas infectadas em comparação a plantas saudáveis. Além disso, há diferentes efeitos diretos e/ou indiretos dos vírus em seus vetores, alterando a atratividade para pouso, adaptação, comportamento alimentar, longevidade e oviposição (DÁDER *et al.*, 2017; EIGENBRODE *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2018).

3. Objetivos

- (i) Identificar e caracterizar por técnicas moleculares isolados brasileiros de carlavírus que infectam brássicas, provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil, pelo sequenciamento de porções genômicas correspondentes ao terminal 3' do RNA viral (ORF 5, ORF 6 e terminal 3' não traduzido);
- (ii) Analisar a variabilidade genética de dois isolados de cole latent virus (CoLV) provenientes do Estado de São Paulo e Alagoas pelo sequenciamento completo dos respectivos genomas;
- (iii) Identificar por PCR e RT-PCR as espécies virais em infecções simples ou em coinfeções, presentes em brássicas, provenientes de diferentes Estados do Brasil;
- (iv) Avaliar o comportamento de variedades comerciais de brássicas frente à infecção experimental com dois isolados de CoLV de couve (*B. oleracea* var. *acephala*);

4. Material e métodos

4.1. Isolados virais

As amostras de brássicas analisadas foram obtidas em áreas destinadas à produção de hortaliças nos Estados de Alagoas, São Paulo, Goiás e Paraná, além do Distrito Federal. As amostras foram constituídas por espécies cultivadas e não cultivadas de brássicas sintomáticas e assintomáticas, identificadas com o nome da espécie e local da coleta, além de receberem um código para identificação do isolado (Tabela 4, Figuras 4 e 5).

Tabela 4: Relação das amostras de brássicas coletadas em diferentes Estados brasileiros

Código	Hospedeira		Data	Procedência	Sintomas
	Nome Científico / (nome popular)				
T4	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	-	-	Socorro (SP)	-
T6	<i>Armoracia rusticana</i> (raiz-forte)	25/06/2012	-	Divinolândia (SP)	-
T9	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	16/07/2012	-	Monte Alegre do Sul (SP)	-
T15	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	-	-	Distrito Federal (DF)	Mosaico foliar
T25	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	26/05/2015	-	Divinolândia (SP)	Clareamento de nervuras/mosaico foliar
T36	<i>B. rapa pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/09/2015	-	Santo Antônio do Pinhal (SP)	Clareamento de nervuras/mosaico foliar
T62	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	30/09/2015	-	Pindamonhangaba (SP)	Clareamento de nervuras, mosaico e deformação
T63	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	30/09/2015	-	Pindamonhangaba (SP)	Mosaico, deformação e pontos cloróticos
T64	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	30/09/2015	-	Pindamonhangaba (SP)	Mosaico, deformação e pontos cloróticos
T89	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	-	-	Ubatuba (SP)	Mosaico, clareamento e necrose de nervuras
T90	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	05/07/2017	-	Arapiraca (AL)*	Clareamento de nervuras/mosaico foliar
T107	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	-	-	Pinhais (PR)*	-
T109	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	-	-	Pirenópolis (GO)*	-
T110	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	-	-	Pirenópolis (GO)*	-

Legenda: (-) sem informação disponível; (negrito) isolados selecionados para a realização dos testes descritos neste trabalho. *Amostras coletadas pelo Prof. Dr. E.W. Kitajima.

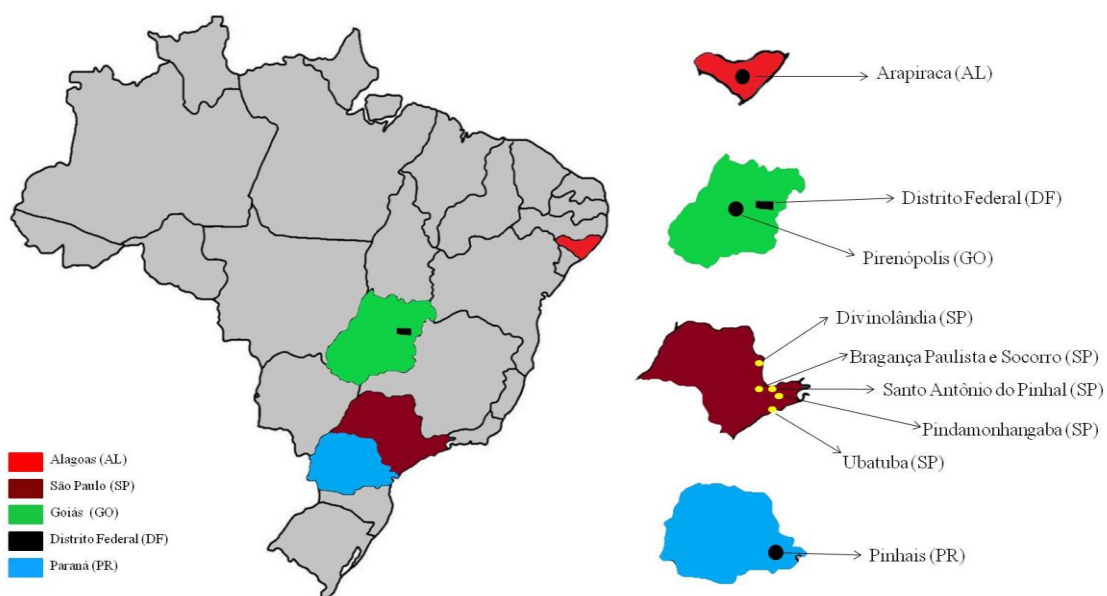


Figura 4: Estados brasileiros e cidades onde foram coletadas as amostras de brássicas.

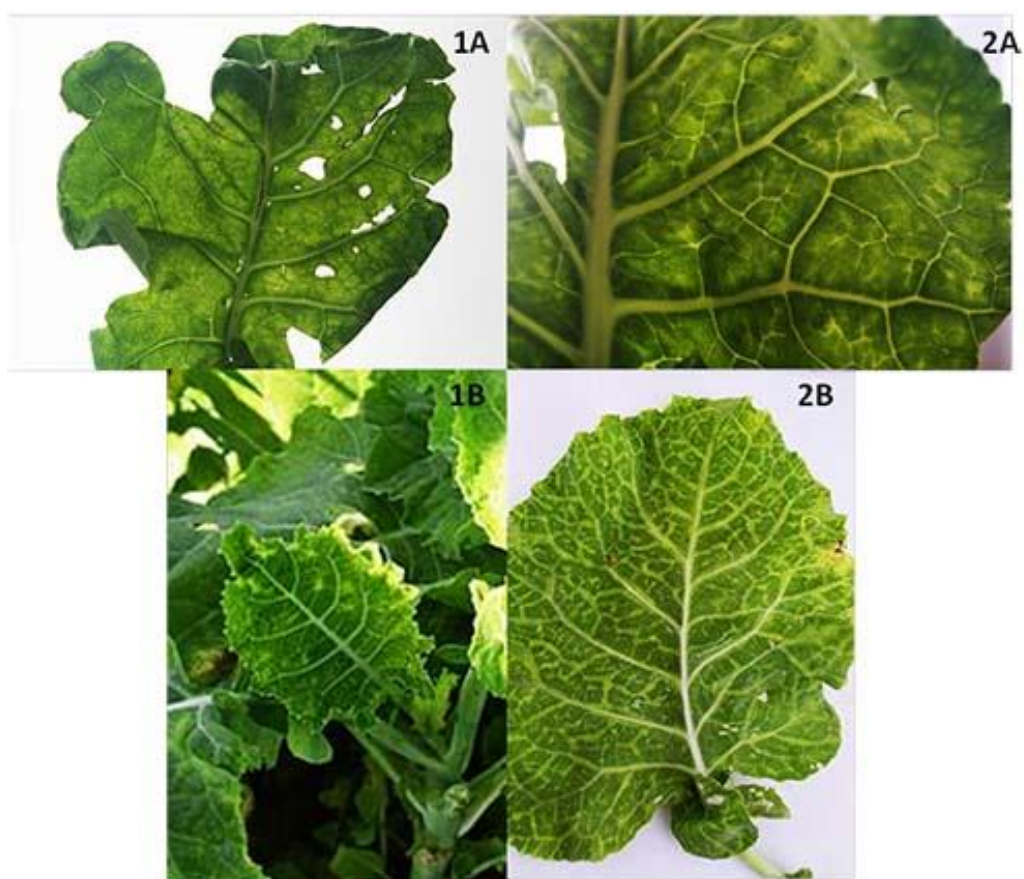


Figura 5: 1A e 2A – Folhas de plantas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) com sintomas de clareamento de nervuras e mosaico induzidos pelo isolado de carlavírus T90; 1B e 2B – Folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) com sintomas de clareamento de nervuras e mosaico induzidos pelo isolado T25.

4.2. Armazenamento de folhas infectadas

As amostras foliares analisadas foram cortadas em pequenos fragmentos (aproximadamente 2 mm de largura e 2 cm de comprimento) e transferidas para placas de Petri contendo 1,6 g de cloreto de cálcio (CaCl_2) para cada grama de folha fresca (peso do $\text{CaCl}_2 = 2 \times 80\%$ referente ao peso fresco foliar). No interior da placa de Petri, os fragmentos foliares foram separados do CaCl_2 com uma tela de náilon (para evitar a queima dos tecidos foliares). Em seguida, as placas de Petri foram mantidas a -20°C por 3 meses para a total desidratação do tecido foliar. Após esse período, as amostras desidratadas foram transferidas para tubos de plástico (com capacidade para 10 mL) contendo cloreto de cálcio e algodão (para evitar que o material vegetal entrasse em contato com o CaCl_2). Após a transferência para tubos, os isolados foram armazenados a -20°C e depositadas na coleção de vírus de plantas do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (LFF) do Instituto Biológico (IB).

4.3. Obtenção de plantas para realização dos testes biológicos

Para a realização dos testes biológicos, foram realizadas semeaduras de espécies de plantas indicadoras das famílias *Amaranthaceae* e *Solanaceae*, além de espécies/variedades comerciais de *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae* e *Fabaceae* (Tabela 5) em bandejas de polipropileno (6 cm de altura x 28 cm de largura x 33 cm de comprimento), utilizando terra esterilizada em autoclave (120°C / 30 minutos). Após a germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de polipropileno (10 cm de diâmetro x 6 cm de altura). As sementeiras e os vasos com as plântulas foram mantidos em casa de vegetação sob condições de temperatura ambiente e irrigação controlada.

Tabela 5: Espécies botânicas avaliadas em testes de transmissão mecânica dos isolados T25 e T90.

Família	Espécie (nome vulgar)
Amaranthaceae	<i>Chenopodium giganteum</i> (amaranticolor) <i>Gomphrena globosa</i> (perpétua) <i>Spinacia oleracea</i> (espinafre ‘Nova Zelândia’)
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis ‘Precoce Piracicaba’) <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa ‘Natsume’) <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (couve-flor ‘Juliana’) <i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> (couve-rábano ‘Branca’) <i>Eruca sativa</i> (rúcula ‘Astro’) <i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça) <i>R. sativus</i> (rabanete ‘n°19’)
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i> (abobrinha-de-moita ‘Caserta’) <i>Citrullus lanatus</i> (melancia ‘Charleston Gray’) <i>C. lanatus</i> (melancia ‘Crimson Sweet’) <i>C. lanatus</i> (melancia ‘Fairfax’) <i>Cucumis sativus</i> (pepino caipira)
Fabaceae	<i>Pisum sativum</i> (ervilha ‘Triofin’)
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i> (pimentão ‘cascadura Ikeda’) <i>Datura stramonium</i> (figueira-brava) <i>Nicotiana debneyi</i> <i>N. glutinosa</i> <i>N. megalosiphon</i> <i>N. sylvestris</i> <i>N. tabacum</i> ‘Samsun’ <i>N. tabacum</i> ‘Samsun NN’ <i>N. tabacum</i> ‘White Burley’ <i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’ <i>Solanum melongena</i> (berinjela ‘Embu’)
Poaceae	<i>Zea mays</i> (milho-verde ‘híbrido Itapua 700’)

4.4. Inoculação mecânica

Os testes biológicos, para avaliar o círculo de hospedeiras, foram realizados utilizando os isolados T25 e T90 de carlavírus armazenados, previamente, em cloreto de cálcio a -20°C. O inoculo foi preparado pela maceração em tampão fosfato 0,01 M pH 6,0 acrescido de sulfito de sódio (5% de sulfito de sódio, 1,06 g de Na₂HPO₄ e 0,54 g de KH₂PO₄ para 1000 mL de água destilada) na proporção de 1:5 (g:mL), polvilhando sobre as folhas a serem inoculadas carburundum como abrasivo. O extrato (inoculo) foi obtido pela maceração com o auxílio de almofariz e pistilo de porcelana, previamente esterilizados (autoclavados) a 120°C por 40 minutos. As plântulas foram inoculadas após o desenvolvimento de um par de folhas

verdadeiras, sendo a inoculação de cada isolado realizado em lotes constituídos por 5 plantas de cada espécie (para cada isolado utilizado). Para cada tratamento, uma planta da mesma espécie foi friccionada somente com tampão, constituindo assim a testemunha (controle negativo). A inoculação foi realizada na superfície adaxial das folhas, sendo este processo realizado em duas folhas por planta. Após a inoculação, as plantas foram lavadas com água e mantidas em casa de vegetação para a observação do surgimento de sintomas. Trinta dias após a inoculação, amostras de folhas assintomáticas e sintomáticas foram coletadas para a realização de testes sorológicos (PTA-ELISA) e extração de RNA para RT-PCR.

4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Folhas sintomáticas de brássicas foram submetidas a observações ao MET. Para tanto, foi utilizada a técnica de contrastação negativa (*leaf dip*) para a visualização da morfologia das eventuais partículas virais presentes nas amostras (KITAJIMA & NOME, 1999). Para tanto, primeiramente foi realizada a sensibilização da grade (microtela) para microscópio eletrônico de transmissão com o extrato da planta preparado em tampão fosfato pH 7,0 durante 5 minutos. Após a sensibilização, procedeu-se a lavagem da grade com água destilada. Com a finalidade de intensificar o contraste, a grade sensibilizada foi depositada sobre uma gota de acetato de uranila 5% preparado em água destilada durante 5-30 minutos (Obs: para a correta contrastação a parte sensibilizada da grade com o extrato da planta deve estar voltada para a gota de acetato de uranila). Em seguida, a microtela foi depositada sobre um pedaço de parafilme no fundo de uma placa de Petri, devidamente protegida da poeira ambiente. Em seguida, lavou-se a grade em água destilada. O excesso de água foi absorvido em papel filtro, podendo-se então colocar a grade sobre uma gota de citrato de chumbo durante 5-30 minutos, lavando-se e secando-se como descrito anteriormente. Após a contrastação, a grade sensibilizada e contrastada foi examinada ao MET.

Para a observação das partículas virais e das alterações ultraestruturais (inclusões citoplasmáticas), no interior das células das folhas de brássicas analisadas, foram realizadas secções ultrafinas de tecidos foliares fixados em mescla de glutaraldeído/paraformaldeído, pós-osmicado, desidratado e emblocado em resina epóxica (MARTELLI & RUSSO, 1984).

4.6. PTA-ELISA (*Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Para a realização do PTA-ELISA, foi, inicialmente, realizada a adsorção do antissoro policlonal de CoLV (gentilmente cedido pelo Prof. E.W. Kitajima – NAP-MEPA, ESALQ-

USP). Para esta etapa foram utilizadas folhas sadias de couve-chinesa, com o objetivo de se reduzirem as reações inespecíficas (reconhecimento de proteínas da planta pelo antissoro). Para a obtenção do extrato, folhas sadias de couve-chinesa foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0, acrescido de ‘Tween 20’ (5%) e polivinilpirrolidona (PVP) na proporção 1:10 (g:mL). Após a filtragem, utilizando gaze, foi adicionado ao extrato o antissoro na diluição 1:3000 (diluição recomendada pelo Prof. E.W. Kitajima), sendo a preparação incubada em estufa (Quincy Lab. INC, modelo 10-140 Incubator) a 37°C por uma hora. Em seguida, o extrato foi submetido à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos (Centrifuga Eppendorf, modelo 5417R). Após centrifugação, coletou-se o sobrenadante e ao volume final adicionou-se 0,5% de soro albumina bovina (BSA).

Para a sensibilização da placa de ELISA com os antígenos, foram preparados extratos a partir de 0,1g de folhas frescas, obtidas a partir das plantas inoculadas mecanicamente com os isolados T25 e T90. Os fragmentos foliares foram macerados em presença de tampão carbonato de sódio 0,05M, pH 9,6 (1,59 g de Na₂SO₃, 2,93 g de NaCO₃ e 0,2 g NaN₃ para 1000 mL de água destilada) na proporção de 1:10 (p/v). As macerações foram realizadas em sacos plásticos (10 x 15cm) e os extratos transferidos para microtubos de 1,5 mL, sendo centrifugadas a 12.000 rpm por 3 minutos (rotor de ângulo fixo modelo FA-45-30-11 da Centrifuga Eppendorf, modelo 5417R). Em seguida, foram aplicados 50 µL dos extratos de cada isolado em microplaca(s) (Nunc®). Cada amostra foi aplicada em triplicata (3 poços) para evitar erros de interpretação ou obtenção de falsos negativos. Como controles positivos foram utilizadas folhas de brássicas infectadas (experimentalmente) com isolados de carlavírus mantidos na coleção do LFF/IB, e como controles negativos foram utilizadas folhas sadias de couve-chinesa. Após incubação da(s) placa(s) em estufa a 37°C por 2 h, foram realizadas lavagens (3x), utilizando tampão de lavagem (fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4, acrescido de 0,5% de ‘Tween20’). Em seguida, foi realizado o bloqueio, com o objetivo de se reduzir as reações inespecíficas, utilizando tampão PBSTPo pH 7,4 (tampão fosfato de sódio, tampão de lavagem e 2,0 g de polivinilpirrolidona, PVP), acrescido de 2% de leite em pó desnatado e incubado a 4°C por 12h. As placas foram então lavadas (3x) com tampão de lavagem, sendo, em seguida, adicionado o antissoro (previamente adsorvido). Após incubação a 37°C por 2 h, foi feita a lavagem da placa (3x) com tampão de lavagem e, em seguida, adicionado o anticorpo “anti-coelho” (*anti-rabbit*) conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma®), previamente diluído em tampão PBSTPo, na proporção 1:30.000. Após incubação a 37°C por 2 h, procedeu-se novamente a lavagem da placa (3x) quando então foi adicionado o substrato p-nitrofenilfosfato (Sigma®) diluído em tampão substrato pH 9,8 (9,7 mL de

dietolonamina, 0,01g de $MgCl_2$, 0,02 g de NaN_3 para 100 mL de água destilada). Foram realizadas 4 leituras de absorbância no comprimento de onda de A_{405nm} em intervalo de 30 minutos em leitor de ELISA *Microplate reader 3550-UV* (Bio-Rad). Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram valores de absorbância três vezes superior aos valores do(s) controle(s) negativo(s) (CLARK & BAR-JOSEPH, 1984). As amostras positivas foram armazenadas em cloreto de cálcio a $-20^\circ C$ e depositadas na coleção do do LFF/IB.

4.7. Extração de RNA total

As extrações de RNA total foram obtidas a partir de 0,1 g de cada amostra de folhas infectadas. Com auxílio de almofariz e pistilo (previamente esterilizados), os fragmentos foliares foram triturados na presença de nitrogênio líquido (N_2) até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, adicionou-se 1 mL do produto comercial *TRizol[®] Reagent* (Invitrogen). As amostras foram vertidas em microtubos de 1,5 mL (livres de RNAses), devidamente identificados e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se 200 μL de clorofórmio, e os tubos foram submetidos à agitação vigorosa em *vortex* (*Vortex Gene 2*, Scientific Industries SiTM). As amostras foram então incubadas por mais 3 minutos a temperatura ambiente e submetidas à centrifugação 12.000 rpm por 15 minutos a $4^\circ C$ (rotor de ângulo fixo modelo FA-45-30-11 da Centrifuga Eppendorf, modelo 5417R). Em seguida, transferiu-se o sobrenadante (fase aquosa) para microtubos novos, adicionaram-se 500 μL de álcool isopropílico (1 volume), e promoveu-se a homogeneização por inversão e, em seguida, procedeu-se a incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm a $4^\circ C$. O isopropanol (sobrenadante) foi descartado e os RNA precipitados foram lavados com 1 mL de etanol 70%. O etanol foi descartado e os tubos permaneceram a temperatura ambiente para a total evaporação do álcool. Os RNA foram ressuspensos em 40 μL de água tratada com DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*) e armazenados a $-20^\circ C$ e, em alguns casos, também foram armazenados a $-80^\circ C$.

4.8. Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas, para a detecção de isolados do cauliflower mosaic virus (CaMV) por PCR, foram feitas a partir de 0,1 g de folha fresca por amostra. Com auxílio de almofariz e pistilo (previamente esterilizados), o material vegetal foi triturado

na presença de nitrogênio líquido (N₂) até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, o macerado foi transferido para microtubos de 1,5 mL (livres de RNAses) e adicionados 50 µL de tampão de extração 0,1M pH 8,0 (Tris-HCl 0,1M pH 8,0, EDTA 0,05M, NaCl 0,5M, 1% de SDS e β-mercaptoetanol 0,01M). As amostras foram submetidas à agitação vigorosa em *vortex* (*Vortex Gene 2*, Scientific Industries Si™) e incubadas a 65°C por 5 minutos. Foram, então, adicionados 150 µL de acetato de potássio 5M e as amostras foram novamente submetidas à agitação vigorosa em *vortex* (*Vortex Gene 2*, Scientific Industries Si™), sendo os microtubos mantidos em gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos, à 10.000 rpm (rotor fixo modelo FA-45-30-11 da centrifuga Eppendorf modelo 5417R), sendo transferido, em seguida, o sobrenadante (fase aquosa) para novos microtubos de 1,5 mL (livres de RNAses) e adicionaram-se 350 µL de isopropanol e os microtubos foram agitados por inversão e submetidos à centrifugação por 10 minutos à 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70%. As amostras foram, então, submetidas a uma centrifugação de 5 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, o etanol foi descartado e os tubos permaneceram a temperatura ambiente para a total evaporação do álcool. Após a secagem, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água estéril (livre de RNAses) (DELLAPORTA *et al.*, 1983).

4.9. RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*)

A síntese das moléculas de DNA complementares (cDNA), especificamente realizada para o CoLV foi realizada utilizando 3 µL das soluções de RNAs totais extraídos com *TRizol*[®] *Reagent* (Invitrogen), que foram transferidos para um microtubo de 0,6 µL, em presença de 50 pmoles (1 µL) de oligonucleotídeos iniciadores complementares (OligodT 21 ou CoLV-II) e água livre de RNAses para um volume final de 10 µL. Os microtubos foram incubados a 70°C por 3 minutos e colocados imediatamente em gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 µL do tampão da enzima transcriptase reversa (5x) (Promega[®]), 1 µL da mistura de deoxinucleotídeos, dNTPs (2,5 mM) e 1 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega[®]). Esta mistura, com volume final de 25 µL, foi incubada a 37°C por 60 minutos. Para as reações de PCR foram adicionados a um microtubo de 0,6 µL, 2 µL do cDNA, 1 µL (5 U/µL) da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]), 5 µL do tampão da enzima (10x) (Invitrogen[®]), de acordo com as recomendações e especificações do fabricante, 3 µL de cloreto magnésio (50 mM), 1 µL da mistura de dNTPs (2,5 mM), 1 µL (50 pmoles) de cada oligonucleotídeo, senso e antisenso (complementar) (Figura 6 e Tabela 6). Os

microtubos foram transferidos para termociclador (PTC100, MJ Research) e as condições para amplificação foram: 5 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C, com extensão final de 2 minutos a 72°C. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,2%, em presença de brometo de etídeo (0,01%), sob luz ultravioleta em transluminador (*Eagle Eye™ - II*, Stratagene). Também foram realizadas análises por RT-PCR e PCR para a detecção do TuMV e para o CaMV, respectivamente, vírus comumente encontrados em brássicas (RODRIGUES, 2019).

Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR para amplificação de fragmentos dos isolados de CoLV.

Vírus	Porção Genômica	Nome dos Iniciadores	Sequências dos primers	Fragmento amplificado	Referências		
CoLV		Carla-Uni	5' – GGAGTAACCGAGGTGATACC – 3'	~120 pb	Badge <i>et al.</i> (1996) Pappu <i>et al.</i> (1993)		
		OligodT-21	5' – TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT – 3'				
	CP	OligodT-21	5' – TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT – 3'	~ 940 pb	Pappu <i>et al.</i> (1993) Gaspar <i>et al.</i> (2008)		
		Carla-CP	5' – GGBYTNGGBBTNCNCANGA – 3'				
		CoLV-I	5' – ATGCGCCCAGATCCC – 3'			~363 pb	Rodrigues (2019)
		CoLV-II	5' – TACATGTTRACGCACAACGC – 3'				

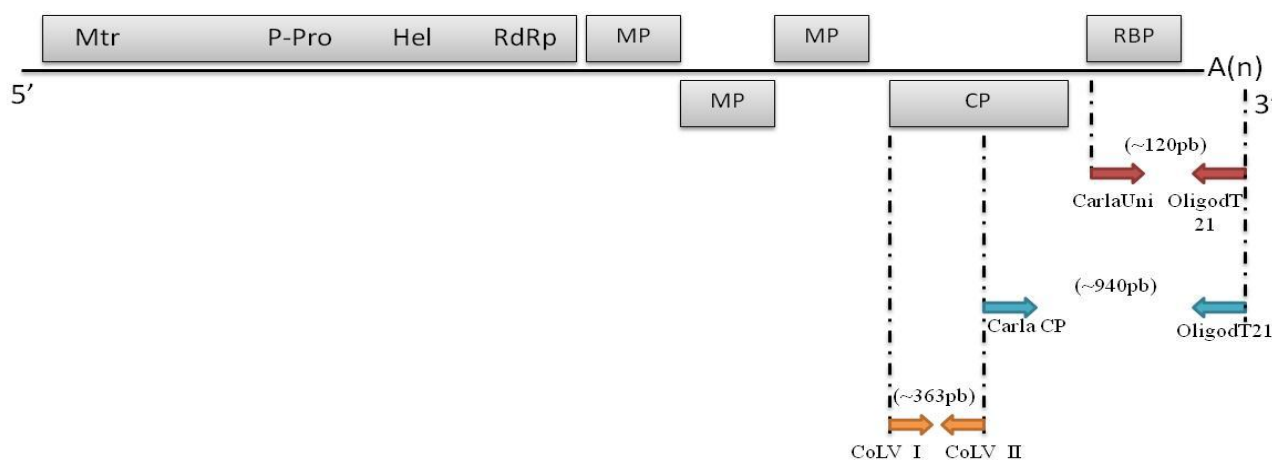


Figura 6: Esquema da organização genômica de espécies de carlavírus com os respectivos sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas RT-PCR. Informações dos oligonucleotídeos estão representados na Tabela 6.

4.9.1 Análise da diversidade genética dos isolados virais

Produtos de RNA total e DNA, extraídos a partir de folhas das amostras de brássicas, foram utilizados como molde para a síntese de cDNAs e amplificações via PCR (**item 4.9**). Os produtos obtidos a partir das amplificações foram eluídos do gel de agarose com kits de purificação *Pure Link® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen) e ressuspendidos em água estéril, conforme recomendações do fabricante. Após a purificação, os fragmentos de DNA foram submetidos ao sequenciamento pelo método de terminação de cadeia (SANGER *et al.*, 1977) utilizando o kit *Big Dye* e o sequenciador 3500XL (Applied Biosystems).

4.10 Sequenciamento de alto rendimento e montagem das sequências genômicas virais

Para a realização do sequenciamento dos genomas virais foram selecionados dois isolados de couve (T25, proveniente de Divinolândia, SP e T90, proveniente de Arapiraca, AL). Os isolados foram inoculados em plantas de couve-chinesa, que foram mantidas em casa de vegetação. Vinte dias após as inoculações, amostras foliares foram submetidas à extração de RNA total com reagente Trizol (**item 4.7**) e purificados utilizando o kit *RNeasy Mini* (Qiagen). Os RNAs obtidos foram processados no Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP) e submetidos à técnica de sequenciamento de alto rendimento (HTS) associado à tecnologia HiSeq 2500 technology (Illumina, San Diego, USA).

A montagem das sequências obtidas de HTS foi realizada utilizando o programa *Geneious Package* (versão 10.2.2) e *Trinity* (v 2.5.1). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com genomas completos de outras espécies de *Carlavirus*, utilizando o programa *Vector NTI Advance 11*. As diferentes ORFs identificadas nos genomas dos isolados T25 e T90 foram comparadas, uma a uma, com sequências completas e parciais de espécies da família *Betaflexiviridae*, com ênfase no gênero *Carlavirus* disponíveis no *GenBank*. Para estabelecer uma matriz de identidade, as sequências da CP e RdRp foram submetidas ao Programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT) versão 1.2 para a obtenção do alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos dos isolados T25 e T90 caracterizados neste trabalho com outras sequências de nucleotídeos de espécies distintas de carlavírus e também da família *Betaflexiviridae* depositadas no *GenBank* (Tabela 7). Análises

filogenéticas de máxima verossimilhança (com *bootstrap* para 1500 replicações), baseadas nos alinhamentos múltiplos de nucleotídeos, foram realizadas com o auxílio do programa MAFFT versão 7 (KATO e STANDLEY, 2013).

Tabela 7: Sequências completas de isolados virais, depositadas no *Genbank*, utilizados nas análises filogenéticas e de identidade de Carlavirus.

Nome do Isolado	Isolado viral	Acrônimo	Acesso <i>Genbank</i>	Local de Origem
D	Aconitum latent virus	AcLV	AB051848	Japão
01227	Actinidia seed borne latent virus	ASbLV	MF440375	Nova Zelândia
TP7-93B	Actinidia virus B	AcVB	NC_016404	Nova Zelândia
-	African oil palm ringspot virus	AOPRV	NC_012519	-
Bittergold	American hop latent virus	AHLV	JQ245696	Estados Unidos
SK	Atractylodes mottle virus	AtrMoV	KR349343	Coreia do Sul
ACLSV-BJ	Apple chlorotic leaf spot virus	ACLSV	KU960942	China
XY	Apple stem grooving virus	ASGV	KX686100	China
AKS	Apple stem pitting virus	ASPV	KY242757	China
A18	Apricot latent virus	ALV	HQ339956	Itália
Sus2	Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus	APCLSV	NC_006946	Itália
Tas3	Apricot vein clearing associated virus	AVCaV	KY132099	Austrália
CNPH	Arracacha virus V	AVV	NC_034264	Brasil
Tatao5	Asian prunus virus 1	APV1	NC_025388	Estados Unidos
JH	Asian prunus virus 2	APV2	KY310582	Coreia do Sul
-	Banana mild mosaic virus	BanMMV	NC_002729	Austrália
Arkansas	Blackberry virus A	BVA	MG254193	Estados Unidos
NJ-2	Blueberry scorch virus	BBScV	NC_003499	-
J	Butterbur mosaic virus	ButMV	AB517596	Tóquio
CBV-1_S20	Carrot Ch virus 1	CChV1	KF533711	Reino Unido
CBV-2_S15	Carrot Ch virus 2	CChV2	KF533710	Reino Unido
Aze204	Caucasus prunus virus	CPrV	KM507061	Azerbaijão
S10	Cherry green ring mottle virus	CGRMV	JX501671	China
SA1162-21	Cherry mottle leaf virus	ChMLV	NC_002500	Canadá
FC4	Cherry necrotic rusty mottle virus	CNRMV	EU188438	Japão
8241-2(s1)	Cherry rusty mottle associated virus	CRMaV	KF030870	Estados Unidos
CTLV_8431	Cherry twisted leaf associated virus	CTLaV	KF958838	Estados Unidos
WY	Cherry virus A	CVA	KY445749	Coreia do Sul
S	Chrysanthemum virus B	CVB	AB245142	Japão
Actinidia	Citrus leaf blotch virus	CLBV	MG604237	China
-	Cole latent virus	CoLV	AY340584	Brasil

-	Coleus vein necrosis virus	CVNV	EF527260	Estados Unidos
CPMMV:BR:GO:01:1	Cowpea mild mottle virus	CPMMV	KC884248	Brasil
-	Currant virus A	CuVA	NC_029301	República Checa
K	Daphne virus S	DVS	NC_008020	Coreia do Sul
SW3.3	Diuris virus A	DVA	JX173276	Austrália
SW3.3	Diuris virus B	DVB	JX173277	Austrália
5/18-05-2010	Gaillardia latent virus	GaILV	KJ415259	Alemanha
-	Garlic commom latent virus	GarCLV	KX255694	Índia
-	Grapevine berry inner necrosis virus	GINV	NC_015220	Japão
PA3	Grapevine rupestris stem pitting-associated virus	GRSPaV	AF026278	-
-	Grapevine virus A	GVA	AF007415	Israel
ISA-BR	Grapevine virus B	GVB	KX790785	Brasil
MD25	Grapevine virus D	GVD	MF774336	Croácia
WAHH2	Grapevine virus E	GVE	JX402759	Estados Unidos
V5	Grapevine virus F	GVF	KP114220	África do Sul
VID561	Grapevine virus G	GVG	NC_040616	Nova Zelândia
TT2016-3	Grapevine virus H	GVH	MF521889	Portugal
VID499	Grapevine virus I	GVI	MF927925	Nova Zelândia
KS	Grapevine virus J	GVJ	MG637048	Turcomenistão
SK704	Grapevine virus T	GVT	MH182704	Eslováquia
HarVA-57	Hardenbergia virus A	HarVA	HQ241409	Austrália
G5	Helleborus net necrosis virus	HeNNV	FJ196835	Estados Unidos
-	Hippeastrum latent virus	HLV	NC_011540	Taiwan
-	Hop latent virus	HpLV	AB032469	Japão
-	Hop mosaic virus	HpMV	EU527979	Austrália
NZ	Hydrangea chlorotic mottle virus	HdCMV	NC_012869	Nova Zelândia
PV-0290B	Kalanchoe latent virus	KLV	FJ531634	Dinamarca
-	Ligustrum necrotic ringspot virus	LNRSV	EU074853	Estados Unidos
SK	Ligustrum virus A	LVA	KX000914	Coreia do Sul
-	Lily symptomless virus	LSV	AJ516059	Coreia do Sul
M22	Melon yellowing-associated virus	MYaV	LC224308	Brasil
-	Mirabilis jalapa mottle virus	MjMV	JN039374	Estados Unidos
pm14	Mume virus A	MVA	NC_040568	Japão
Zhangzhou	Narcissus commom latent virus	NCLV	AM158439	China
Marijiniup4	Nerine latent virus	NELV	NC_028111	Austrália
-	Passiflora latent virus	PLV	DQ455582	Israel
VRS-541	Pea streak virus	PeSV	NC_027527	-
DuraznoMex1	Peach chlorotic mottle virus	PChMV	KY774446	México
DurazMex1	Peach mosaic virus	PMV	KY795997	México
WP	Phlox virus B	PhIVB	EU162589	Estados Unidos
BR	Phlox virus M	PhIVS	EF492068	Estados Unidos
PV-0341	Poplar mosaic virus	PopMV	AY505475	Alemanha
-	Potato latent virus	PotLV	EU433397	Canadá
YN	Potato virus H	PVH	JQ904630	China

Russian wild	Potato virus M	PVM	D14449	Rússia
Bra	Potato virus P	PVP	EU338239	Brasil
Leona	Potato virus S	PVS	AJ863509	Alemanha
Sbrev	Potato virus T	PVT	MH069211	Reino Unido
Aze239	Prunus virus T	PrVT	KF700263	Azerbaijão
Washington	Red clover vein mosaic virus	RCVMV	FJ685618	Estados Unidos
BM-01	Rubus canadensis virus 1	RuCV1	NC_019025	Estados Unidos
SW3	Shallot latent virus	SLV	JQ899443	Austrália
-	Sugarcane striate mosaic-associated virus	SCSMaV	NC_003870	Austrália
Sosa29	Sweet potato C6 virus	SPC6V	JX212747	República Dominicana
-	Sweet potato chlorotic fleck virus	SPCFV	AY461421	Uganda
KF-15	Watermelon virus A	WVA	KY363796	China
SG1	Yam latent virus	YLV	KJ789130	China

Legenda: (-) sem informação disponível.

4.10.1 Amplificação do extremo 5' dos genomas virais

As sequências dos terminais 5' dos isolados virais (T25 e T90) foram obtidas a partir da técnica de *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) utilizando o kit *Smarter®* (*Clontech Laboratories, Mountain View, CA*), conforme as recomendações do fabricante. A síntese do cDNA foi obtida utilizando 1 µL de RNA, 0,5 µL de primer Random e 4 µL de H₂O e incubado sequencialmente a 42°C/90 minutos e 70°C/10 minutos. Após esse período de incubação, foi adicionado 0,5 µL do SMARTER IIA (primer do kit) e mix contendo 2 µL de tampão 5x, 0,25 µL de DTT (ditiotreitól), 0,5 µL de dNTP, 0,25 µL de Inibidor de RNase e 1 µL de transcriptase reversa e, novamente, incubado a 42°C/90 minutos e 70°C/10 minutos, a seguir adicionou-se 5 µL de Tricina – EDTA e incubado por 90 minutos a 42°C, seguido de 10 minutos a 70°C. Depois de obtido o cDNA, foi realizada a PCR, utilizando 0,5 µL de cDNA e adicionado ao mix contendo 5 µL de buffer (2x), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase, 1 µL de UPM³ (10x), 0,2 µL de GSP⁴ (primer desenhado com adaptador), 3,1 µL de água e com um ciclo de amplificação de 94°C por 30 segundos, seguidos de 68°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, repetidos 36 vezes.

³ UPM: Long primer (5' – TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT- 3')

⁴ GSP (primer desenhado com adaptador): GSP (primer desenhado com adaptador: RACE-CoLV-15 (5' – GATTACGCCAAGCTTCCAGGCCACGGCCATGCTTAACC – 3') para o isolado T25; RACE-CoLV-16 (5' – GATTACGCCAAGCTTCGCTTCTAGACCTCTGCCATGACGCAC – 3') para o isolado T90.

Para a realização da nested-PCR, 0,8 µL de produtos de PCR foram misturados ao mix, contendo 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase, 5 µL de tampão, 1,8 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,5 µL de primer F⁵, 0,5 µL de primer R⁶ e 15,7µL de água, com ciclo de amplificação de 94°C por 3 minutos, seguidos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos, sendo este ciclo repetido por 35 vezes. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, em presença de brometo de etídeo (0,01%), sob luz ultravioleta. As bandas foram coletadas e purificadas utilizando o kit *Wizard® SV gel and PCR Clean Up System* (Promega®).

4.10.2 Clonagem e sequenciamento dos fragmentos de genoma viral

Os fragmentos obtidos na nested-PCR foram clonados. A ligação do vetor pGem®T *easy vector system I* (Promega®) foi obtida utilizando 5 µL de produtos de PCR, 1 µL de enzima ligase T4, 1 µL de tampão, 2,5 µL de água e 0,5 µL do vetor e, conforme recomendações do fabricante, sendo esta mistura mantida sob condição de ausência de luz e a 4°C. Em seguida, procedeu-se a diálise da reação utilizando placa de Petri (plástico) contendo 1000 µL de água estéril a qual foi colocada uma membrana de 0,25 µm (Merck Millipore). Em seguida, foram aplicados 10 µL da reação de ligação do vetor sobre a membrana e mantido em temperatura ambiente por 20 minutos. Após a diálise, as soluções com as reações de ligação foram recolhidas da superfície da membrana e misturadas a 40 µL de células competentes (*E. coli* 10Beta) e colocadas em cubetas de electroporação (Biorad) de 0,2 cm (previamente mantidas em gelo por 10 minutos). Após a eletroporação, foi acrescentado 1 mL de meio de cultura SOC (5 mL de glucose 1 M para cada 200 mL de meio SOB⁷) na cubeta e agitado gentilmente com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, a reação foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e mantida em agitador a 37°C por 1 hora a 100 rpm. Após esse período, as culturas bacterianas transferidas para placa de Petri de plástico, contendo 20 mL de meio de cultura LB⁸ (10 g/L de triptona ou peptonas, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar) e mantido aberto por 20 minutos para secar e, em seguida, foi

⁵ *Primer F*: Short primer (5' – CTAATACGACTCACTATAGGGC – 3')

⁶ *Primer R*: Nest-CoLV-15R (5' – TCCAGACATACACTGCAATC – 3') para o isolado T25; Nest-CoLV-16R (5' - ACTATATTCGGACTACGTTGC – 3') para o isolado T90.

⁷ Meio de cultura SOB (12, pH 7,0): 20g de triptonas, 5g de extrato de levedura, 0,5g de NaCl, 10mL de KCl (250 mM) e 5mL/L de MgCl₂ (2M).

⁸ Meio de cultura LB: 10 g/L de triptonas ou peptonas, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 15 g/L de Ágar.

realizada a vedação da placa de Petri utilizando parafilme e deixado para crescer toda a noite a 37°C. No dia seguinte, com o auxílio de palitos de madeira (esterilizados) as colônias brancas obtidas foram riscadas em uma nova placa de Petri contendo meio LB⁶ (sólido) acrescido de ampicilina (100 µg/mL), 500 µL/100 mL de IPTG e 160 µL/100 mL de X-GAL, sendo a placa mantida em estufa a 37°C por 3-4 horas. Em seguida foi feita a PCR das colônias, para a confirmação da clonagem, utilizando 0,08 µL de *Taq* DNA polimerase, 2 µL do tampão da enzima, 0,72 µL de cloreto de magnésio, 0,2 de dNTPs, 0,25 µL do primer R (primer do vetor –M13), 0,25 µL do primer F (primer do vetor – M13) e 6,75 µL de água e, com o auxílio de uma ponteira as colônias foram retiradas e deixadas em contato com o mix por 5 minutos. Após esse período, foi realizada a PCR nas condições de amplificação de 95°C por 2 minutos, seguidos de 95°C por 0,15 minutos, 50°C por 0,15 minutos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, em presença de brometo de etídeo (0,01%), sob luz ultravioleta. Após a PCR das colônias e confirmação da clonagem as amostras foram encaminhadas para sequenciamento pelo método de terminação de cadeia (**item 4.9.1**).

4.11. Detecção de infecções mistas

Durante o processo de triagem, para a detecção do CoLV, as amostras analisadas foram também submetidas a testes moleculares para a detecção de outras espécies de vírus relatadas em brássicas no Brasil. Assim, foram realizados RT-PCR para a detecção do turnip mosaic virus (TuMV, *Potyvirus*) e PCR para a detecção do cauliflower mosaic vírus (CaMV, *Caulimovirus*). Para a constatação da coinfeção com TuMV, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para a capa proteica (CP) e inclusão citoplasmática (CI); para a detecção do CaMV, utilizaram-se oligonucleotídeos específicos para a ORF 1. Todos os procedimentos realizados para a detecção do TuMV e CoLV seguiram protocolos descritos por Rodrigues (2019).

5. Resultados

5.1. Avaliação da gama de hospedeiros dos isolados coletados nas regiões produtoras do Brasil

Foram identificadas por PCR e RT-PCR coinfeções por CoLV e TuMV nas amostras T4, T6 e T110 e do CoLV com o CaMV nas amostras T25, T36, T62, T63, T64, T89, T107 e T110. Na amostra de couve proveniente de Divinolândia, SP (T25), foi detectada a presença de dois vírus: CoLV e CaMV e na T110 foi detectada a presença dos três vírus avaliados (Tabela 8).

Tabela 8: Identificação de turnip mosaic virus (TuMV), cole latent virus (CoLV) e cauliflower mosaic virus (CaMV) nas amostras de brássicas por meio de RT-PCR com *primers* específicos para o turnip mosaic virus (TuMV) e cole latent virus (CoLV), e PCR para o cauliflower mosaic virus (CaMV).

Código	Nome Científico	Nome vulgar	Procedência	TuMV		CoLV	CaMV
				RT-PCR		RT-PCR	PCR
				CI	CP	CP	ORF1
T4	<i>Brassica oleracea</i>	Couve	Socorro (SP)	+	+	+	-
T6	<i>Armoracia rusticana</i>	Raiz-forte	Divinolândia (SP)	+	+	+	-
T9	<i>B. oleracea</i>	Couve	Monte Alegre do Sul (SP)	-	-	+	-
T15	<i>B. oleracea</i>	Couve	Distrito Federal (DF)	-	-	+	-
T25	<i>B. oleracea</i>	Couve	Divinolândia (SP)	-	-	+	+
T36	<i>B. oleracea</i>	Couve	Sto Antônio do Pinhal(SP)	-	-	+	+
T62	<i>B. oleracea</i>	Couve	Pindamonhangaba (SP)	-	-	+	+
T63	<i>B. oleracea</i>	Couve	Pindamonhangaba (SP)	-	-	+	+
T64	<i>B. oleracea</i>	Brócolis	Pindamonhangaba (SP)	-	-	+	+
T89	<i>B. oleracea</i>	Couve	Ubatuba (SP)	-	-	+	+
T90	<i>B. oleracea</i>	Couve	Arapiraca (AL)	-	-	+	-
T107	<i>B. oleracea</i>	Couve	Pinhais (PR)	-	-	+	+
T109	<i>R. raphanistrum</i>	Nabiça	Pirenópolis (GO)	-	-	-	+
T110	<i>B. oleracea</i>	Couve	Pirenópolis (GO)	+	+	+	+

Legenda: (+) resultado positivo; (-) resultado negativo; CI – inclusão citoplasmática; CP – capa proteica; ORF 1 – porção genômica do CaMV que codifica para a proteína de movimento do vírus.

Como na amostra T25 havia coinfeção do CoLV com o CaMV (Tabela 8), antes de iniciar as avaliações, o CoLV T25 foi isolado do CaMV por meio de inoculação mecânica em *N. megalosiphon*, hospedeira diferencial para estes vírus, pois permite a replicação e infecção sistêmica do CoLV e é imune ao CaMV. Para confirmar a ausência do CaMV em *N. megalosiphon* foi realizada a PCR e RT-PCR, respectivamente, 30 dias após as inoculações para a detecção do CaMV e CoLV, com resultado positivo apenas para o CoLV. Os isolados T25 e T90 foram mantidos em *N. megalosiphon* e cerca de 30 dias após as inoculações, as folhas foram coletadas e submetidas à extração de RNA total e RT-PCR com *primers* específicos para carlavírus. Brócolis, couve-chinesa e rúcula, assintomáticas para os dois isolados virais, tiveram resultados positivos em RT-PCR.

Os isolados T25 e T90 foram inoculados em plantas indicadoras pertencentes às famílias Amaranthaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae e Poaceae (Tabela 9). Os dois isolados de carlavírus infectaram espécies pertencentes às famílias Amaranthaceae e Brassicaceae. Em *Chenopodium giganteum* os dois isolados induziram lesões locais nas folhas inoculadas, mas o T25 induziu um maior número de lesões. No caso de couve-flor (variedade Juliana) e couve-rábano (variedade Branca), o isolado T25 induziu mosaico, em três das quatro plantas inoculadas de cada espécie, enquanto que o isolado T90 permaneceu latente nessas hospedeiras, nas quatro plantas inoculadas de cada espécie, sendo a infecção confirmada por RT-PCR (Figura 7). Nas plantas das espécies das famílias Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae e Poaceae não houve a manifestação de sintomas, com exceção da espécie *N. megalosiphon*, da família Solanaceae (Tabela 9), na qual os dois isolados induziram sintomas de mosaico sistêmico. Entretanto, os sintomas causados pelo T25 foram mais severos, com mosaico, deformações foliares e menor desenvolvimento das plantas em comparação aos sintomas causados pelo T90 (Figura 8).

Os dois isolados também foram inoculados em diferentes variedades de melancia (*Citrullus lanatus*) e em uma variedade de berinjela (*Solanum melongena*). Quinze dias após as inoculações não houve qualquer manifestação de sintomas nas variedades de melancia e de berinjela desafiadas.

Tabela 9: Teste biológico em plantas indicadoras pertencentes a diferentes famílias botânicas e RT-PCR com *primers* específicos para a detecção dos isolados de cole latent virus (CoLV) na amostra T25, proveniente de Divinolândia, SP, e T90, proveniente de Arapiraca, AL.

Família	Espécies (variedades)	Sintomas		RT-PCR	
		T25	T90	T25	T90
Amaranthaceae	<i>Spinacia oleracea</i> (espinafre ‘Nova Zelândia’)	SS	SS	-	-
	<i>Gomphrena globosa</i> (perpétua)	SS	SS	-	-
	<i>Chenopodium giganteum</i> (amaranticolor)	LL	LL	+	+
Brassicaceae	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis ‘Precoce Piracicaba’)	SS	SS	+	+
	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa ‘Natsume’)	SS	SS	+	+
	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (couve-flor ‘Juliana’)	M	SS	+	+
	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> (couve-rábano branca)	M	M	+	+
	<i>Raphanus sativus</i> (Rabanete ‘n°19 Sakata’)	SS	SS	-	-
	<i>Eruca sativa</i> (rúcula ‘Astro’)	SS	SS	+	+
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i> (abobrinha-de-moita ‘Caserta’)	SS	SS	-	-
	<i>Citrullus lanatus</i> (melancia ‘Charleston Gray’)	SS	SS	-	-
	<i>C. lanatus</i> (melancia ‘Crimson Sweet’)	SS	SS	-	-
	<i>C. lanatus</i> (melancia ‘Fairfax’)	SS	SS	-	-
	<i>Cucumis sativus</i> (pepino caipira)	SS	SS	-	-
Fabaceae	<i>Pisum sativum</i> (ervilha ‘Trioфин’)	SS	SS	-	-
Solanaceae	<i>Solanum melongena</i> (berinjela ‘Embu’)	SS	SS	-	-
	<i>Datura stramonium</i> (figueira-brava)	SS	SS	-	-
	<i>Nicotiana debneyi</i>	SS	SS	-	-
	<i>N. glutinosa</i>	SS	SS	-	-
	<i>N. megalosiphon</i>	M/DF/AD	M	+	+
	<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’	SS	SS	-	-
	<i>N. tabacum</i> ‘Samsun NN’	SS	SS	-	-
	<i>N. sylvestris</i>	SS	SS	-	-
	<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	SS	SS	-	-
	<i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’	SS	SS	-	-
<i>Capsicum annuum</i> (pimentão ‘cascadura Ikeda’)	SS	SS	-	-	
Poaceae	<i>Zea mays</i> (milho-verde ‘híbrido Itapua 700’)	SS	SS	-	-

Legenda: (+) positivo; (-) negativo; (LL) lesão local; (AD) atraso no desenvolvimento; (L) latência; (M) mosaico; (DF) deformação foliar; (SS) sem sintoma.

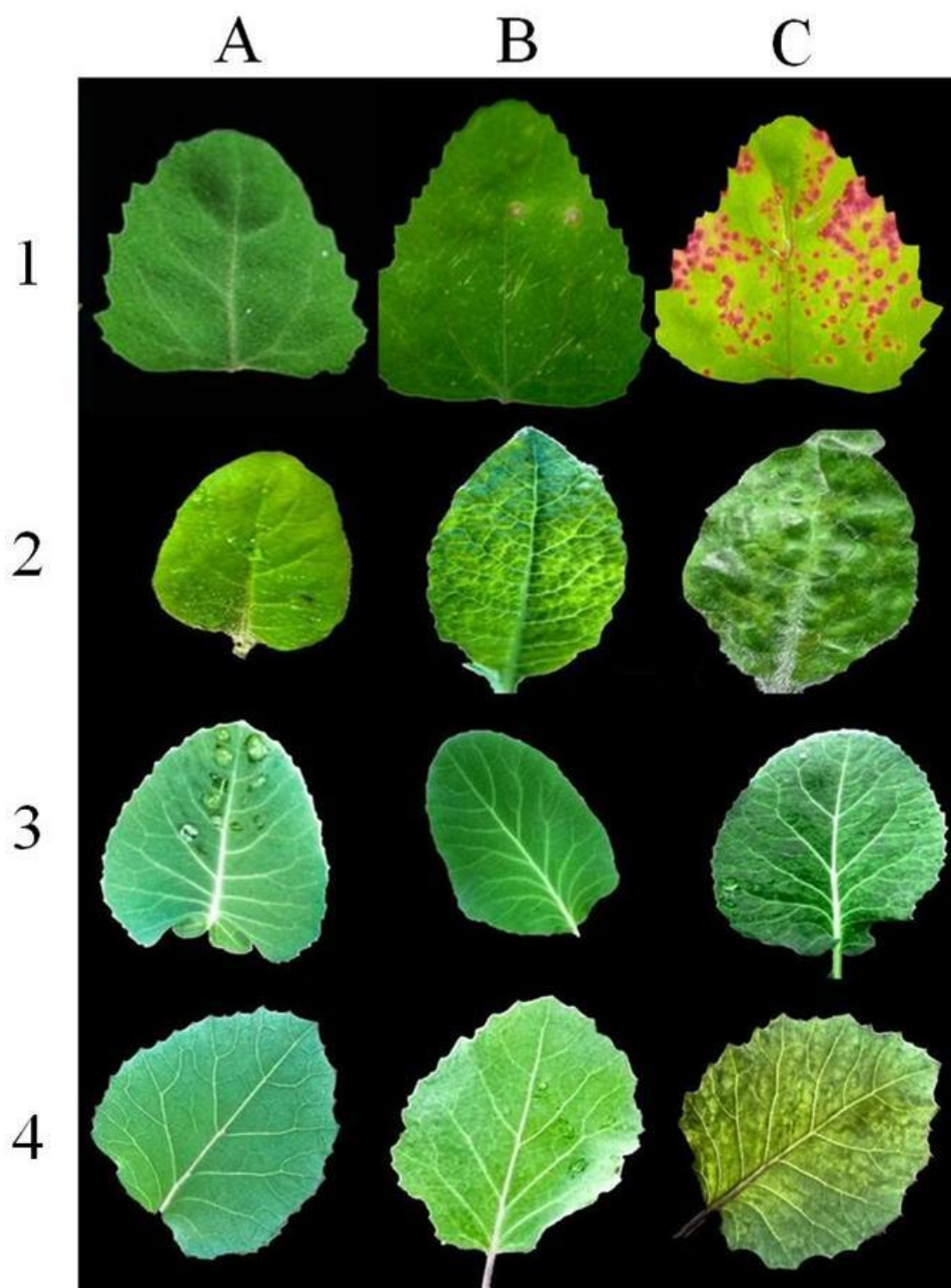


Figura 7: Sintomas de cole latent virus (CoLV) em folhas inoculadas: B) com o isolado T25 de couve (proveniente de Divinolândia, SP) e C) com o isolado T90 (proveniente de Arapiraca, AL); Folhas de *C. giganteum*: 1A – sadia, 1B-com lesões locais necróticas, 1C– com lesões locais; Folhas de *N. megalosiphon*: 2A – sadia, 2B –com clareamento de nervuras; 2C –com mosaico e deformação foliar; Folhas de couve-flor: 3A – sadia, 3B –sem sintoma; 3C –com “mild” mosaico; Folhas de couve-rábano: 4A – sadia, 4B – mosaico; 4C –com mosaico amarelo.

Outra diferença, observada entre as plantas de *N. megalosiphon* inoculadas, foi o tempo para manifestação dos sintomas. O isolado T25 induziu sintomas de mosaico e atraso no desenvolvimento 15 dias após a inoculação nas 4 plantas inoculadas, enquanto que o isolado T90, neste mesmo período, não induziu sintomas. Os sintomas induzidos pelo isolado T90, lesões locais (nas folhas inoculadas) cloróticas que evoluíram para necróticas e mosaico, em *N. megalosiphon*, surgiram somente 20 dias após as inoculações nas 4 plantas desafiadas (Figura 8).

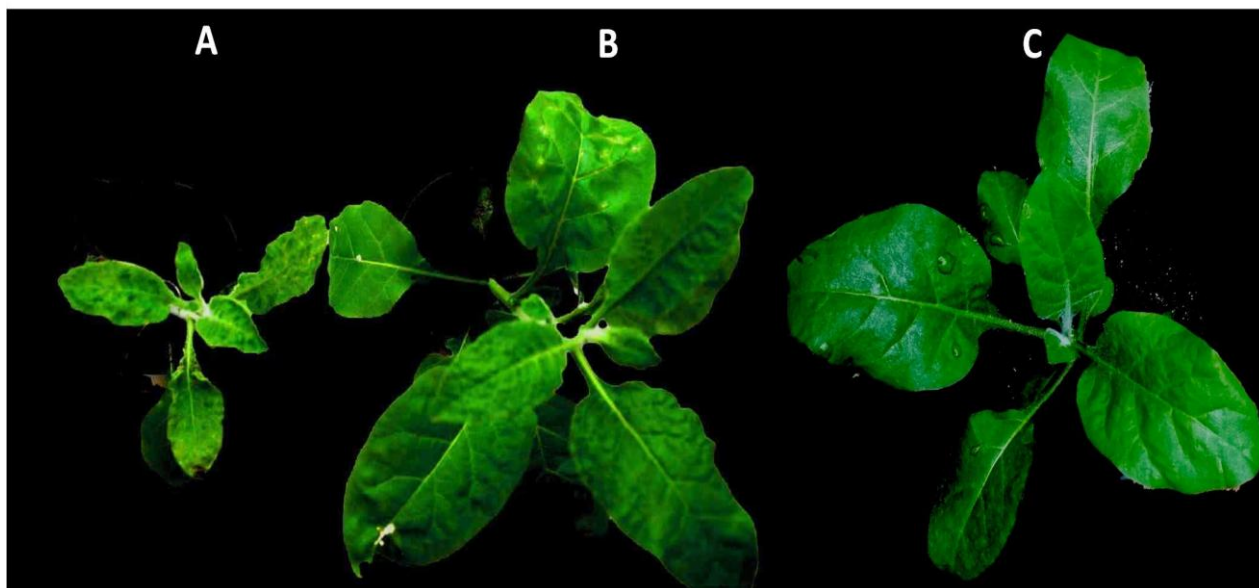


Figura 8: Plantas de *Nicotiana megalosiphon*, 20 dias após as inoculações: A – planta inoculada com o isolado T25 com sintomas de mosaico, deformações foliares, bolhas e atraso no desenvolvimento; B – planta inoculada com o isolado T90 apresentando lesões locais necróticas nas folhas inoculadas e início de mosaico nas folhas mais novas. C – planta sadia de *N.megalosiphon*.

5.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das amostras de plantas infectadas com isolados do CoLV

Em preparações de contrastação negativa (*leaf-dip*), de folhas de brássicas provenientes de Divinolândia, SP (T25), Arapiraca, AL (T90), Pinhais, PR (T107) e Pirenópolis, GO (T109), foi possível observar partículas alongadas flexuosas com cerca de 650 nm de comprimento com uma das extremidades arredondadas, típicas de carlavírus. Em cortes ultrafinos de tecidos foliares das mesmas amostras foram observadas inclusões características de agregados de partículas virais, típicas de carlavírus, no citoplasma de células infectadas (Figura 9).

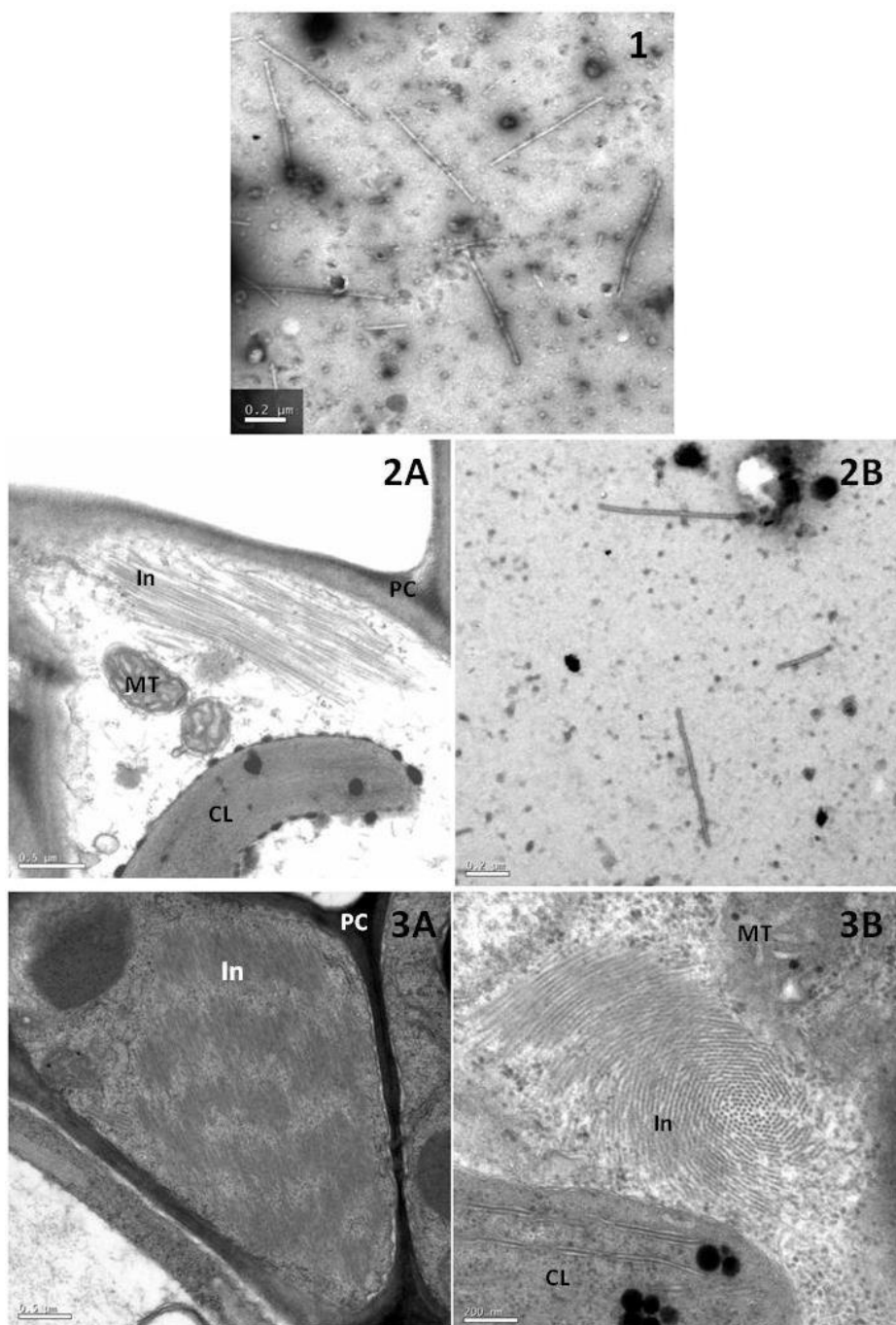


Figura 9: Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) de cortes ultrafinos e preparações rápidas de extratos foliares (*leaf-dip*) de folhas de couve infectadas provenientes de diferentes Regiões do Brasil: 1– *Leaf-dip* de folha de couve proveniente de Pinhais (PR), onde podem ser visualizadas partículas alongadas e flexuosas com cerca de 650 nm de comprimento; 2A – Corte ultrafino de folha de couve, proveniente de Pirenópolis (GO), em que podem ser visualizadas inclusões citoplasmáticas típicas daquelas induzidas por carlavírus; 2B – *Leaf-dip* da amostra de couve de Pirenópolis com partículas típicas de carlavírus; 3A e 3B – Cortes ultrafinos de folha de couve, proveniente de Arapiraca (AL), em que podem ser visualizadas inclusões citoplasmáticas típicas de carlavírus. (Imagens: Dr. E.W. Kitajima, NAP-MEPA, ESALQ, USP). Parede celular (PC), mitocôndria (MT), cloroplasto (CL), inclusão citoplasmática (In).

5.3. Sequenciamento e análises das sequências

Com os resultados de RT-PCR foram obtidos fragmentos de 120 pb e 940 pb a partir das amostras de brássicas. A análise de identidade de nucleotídeos foi realizada com as sequências de 120 pb de 11 isolados comparando-as entre si, e as porcentagens de identidade obtidas foram superiores a 82%, para todos os isolados, sendo a maior porcentagem obtida (99%) entre os isolados T64 e T15 (Figura 10). Na análise feita com as sequências de 940 pb obtidas de 6 dos 11 isolados (T6, T15, T36 e T64), incluindo os isolados T25 e T90, as porcentagens de identidade obtidas entre eles foram superiores a 79% (Figura 11).

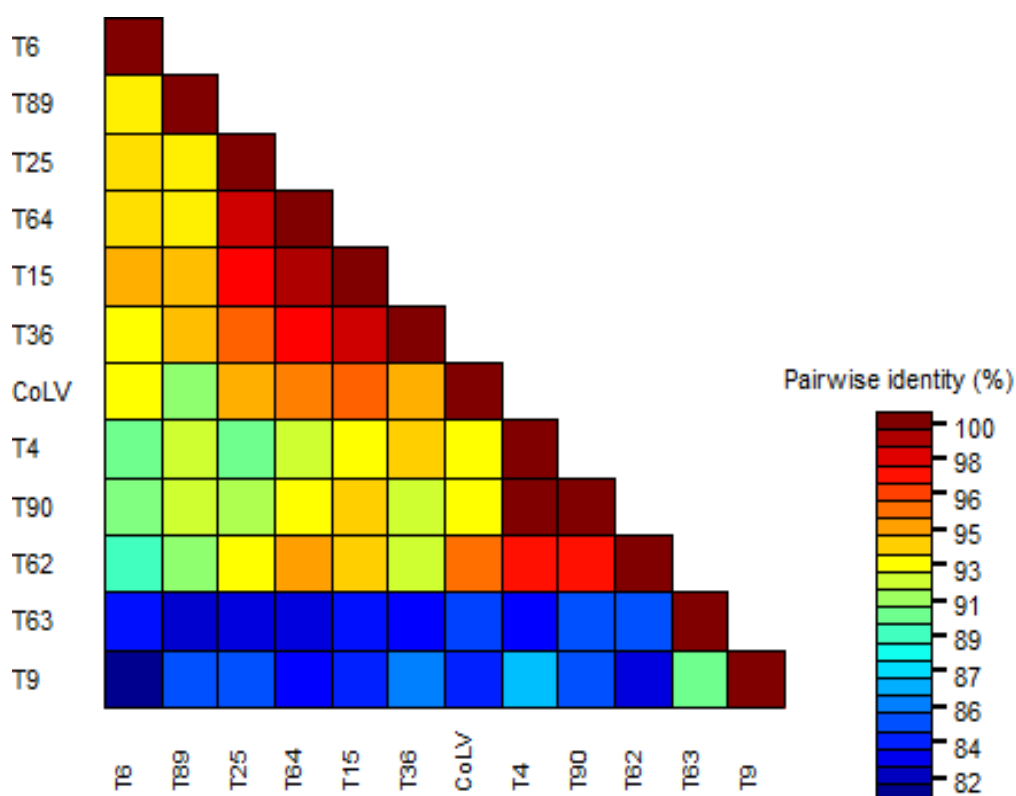


Figura 10: Matriz de identidade de nucleotídeos do fragmento de 120 pb dos isolados de cole latent virus (CoLV) de brássicas. Sequência do isolado identificado como CoLV (AY340584) foi obtida no *Genbank* (depositada por Belintani *et al.*) As informações sobre os isolados constam da Tabela 4 (item 4.1). Informações sobre a porção genômica sequenciada constam da Tabela 7 (item 4.10) e Figura 6 (item 4.9).

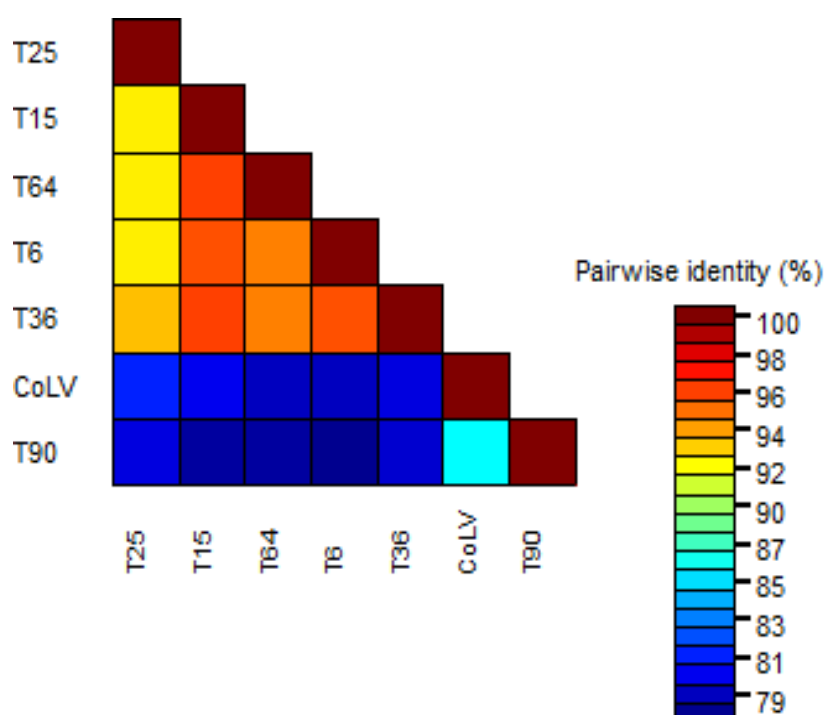


Figura 11: Matriz de identidade de nucleotídeos do fragmento de 940 pb dos isolados de cole latent virus (CoLV) de brássicas. Sequência do isolado identificado como CoLV (AY340584) foi obtida no *Genbank* (depositada por Belintani *et al.*). As informações sobre os isolados constam da Tabela 4 (item 4.1). Informações sobre a porção genômica sequenciada constam da Tabela 7 (item 4.10) e Figura 6 (item 4.9).

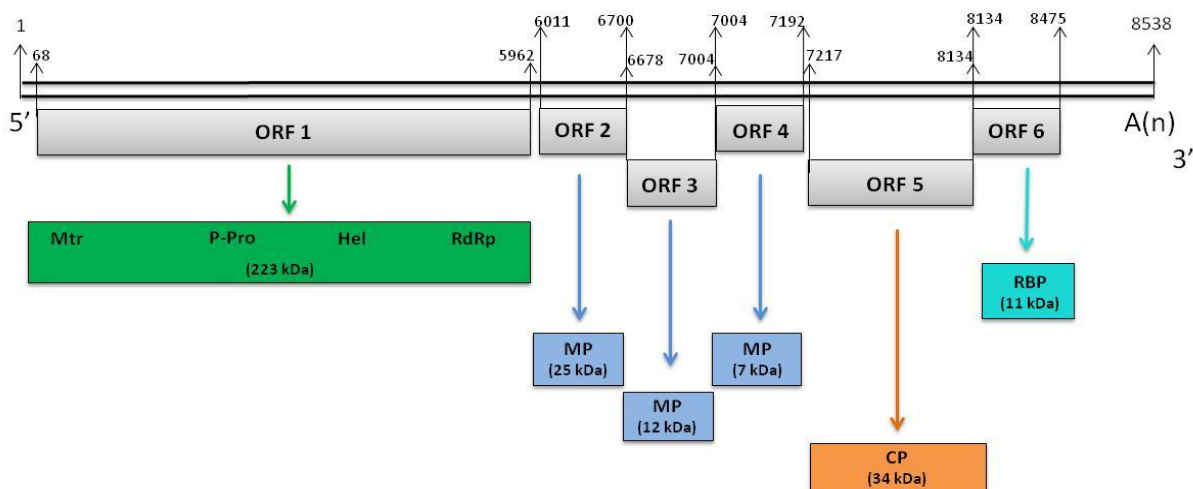
As sequências completas dos RNAs genômicos dos isolados T25 e T90 foram de aproximadamente 8.550 nucleotídeos (8.538 para o isolado T25 e 8.524 para o isolado T90). Ambos apresentaram seis ORFs, organização genômica típica dos carlavírus: ORF 1 (replicase), ORFs 2, 3 e 4 (*triple gene block*), ORF 5 (CP) e ORF 6 (proteína de 11 kDa), além do terminal 3' não traduzido poliadenilado. As análises realizadas com base no genoma completo obtido dos dois isolados de CoLV indicaram a presença de uma peptidase envolvida na autoproteólise da poliproteína de 223 kDa (Figura 12). As sequências completas dos dois isolados foram depositadas no *Genbank* com os seguintes códigos de acesso: MK684348 para o isolado T25 e MK770418 para o isolado T90.

Análises de identidade dos isolados T25 e T90 foram realizadas através de comparações das sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos deduzidos (aa) com outras 40 espécies de *Carlavirus* cujos genomas completos estão disponíveis no *GenBank*. Os isolados T25 e T90 apresentaram porcentagem de identidade de 67,3% para nt e 64,6% para aa, quando comparado às sequências genômicas completas. Porém, a porcentagem de identidade

de nucleotídeos dos isolados T25 e T90 foi inferior a 62% quando comparados com sequências de nucleotídeos completas de outros carlavírus.

Além das análises das sequências genômicas completas dos genomas, foram realizadas análises comparativas por ORFs dos isolados T25 e T90. As análises realizadas com base na ORF 1, que codifica a replicase viral, dos isolados T25 e T90, quando comparadas entre si, indicaram porcentagens de identidade e similaridade de 67% para nt e 70,1% para aa. Ao serem comparados com outros isolados de carlavirus, observou-se que as porcentagens de identidade de nt e aa foram inferiores a 62% e 58%, respectivamente. Nas análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da replicase e também da CP, confirmou-se que os isolados T25 e T90 pertenciam à mesma espécie, porém eram distintos das demais espécies de *Carlavirus*, com porcentagem de identidade de nucleotídeos de no máximo 62% comparadas com o genoma do potato virus M (PVM) (Figura 13 e 14).

T25



T90

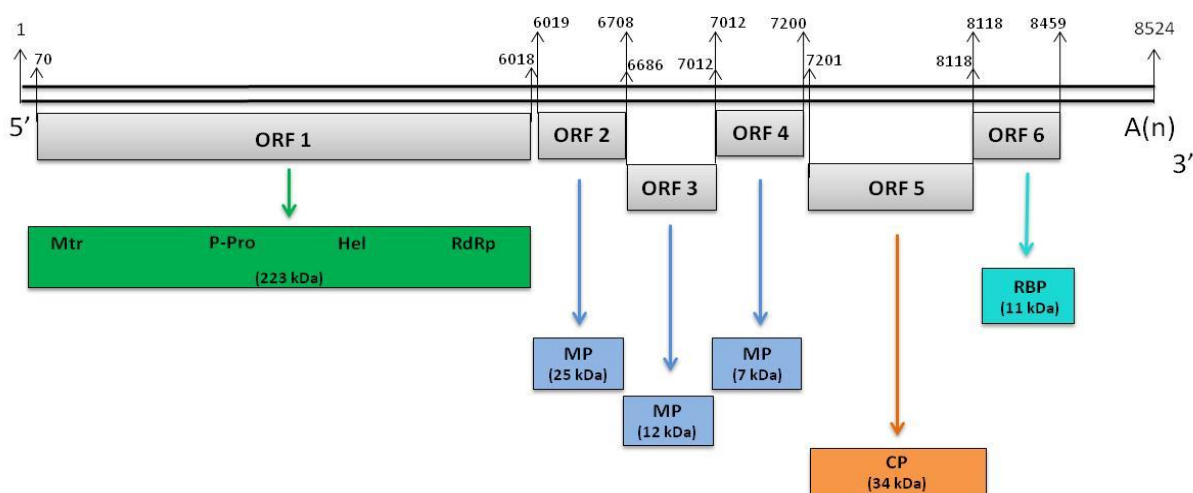


Figura 12: Organizações genômicas dos dois isolados de cole latent virus (CoLV), T25 (código de acesso *Genbank*: MK684348) e T90 (código de acesso *Genbank*: MK770418), sequenciados neste trabalho. As barras pretas numeradas correspondem às moléculas de RNA com 8538 e 8524 nucleotídeos dos isolados T25 e T90, respectivamente. **ORF 1** codifica a replicase viral, proteína com 223 kDa com quatro domínios: metiltransferase (Mtr), *papain-like protease* (P-Pro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); **ORFs 2, 3 e 4** formam o triplo bloco gênico (*Triple Gene Block*, TGB) que codificam proteínas associadas ao movimento do vírus célula a célula (MP); **ORF 5** codifica a capa proteica (CP) do vírus; e **ORF 6** codifica uma proteína rica em cisteína (*RNA-Binding Protein*, RBP), com atividade associada à supressão de silenciamento gênico.

Para o triplo bloco gênico (*Triple Gene Block*, TGB), ORF 2 (TGB 1), ORF 3 (TGB 2) e ORF 4 (TGB 3), comparando os isolados T25 e T90, quando comparados entre si, apresentaram porcentagens de identidade de nucleotídeos inferiores a 65%, enquanto que as porcentagens de identidade de aminoácidos foram inferiores a de 67%. Comparando o motivo TGB dos isolados T25 e T90 entre si, as porcentagens de identidade para cada ORF foram de 65,1% para nt e 67,7 para aa para a ORF 2, 69,1% para nt e 74,1% para aa para a ORF 3 e 60,9% para nt e 56,5% para aa para a ORF 4.

As sequências de nt e aa da ORF 5, que codifica a CP, foram comparadas com a sequência parcial da CP do isolado de CoLV tipo (AY340584), apresentando 78% e 96% de identidade de nt e aa, respectivamente, para o isolado T25 e 81,5% e 94% para o isolado T90. As porções genômicas da CP dos isolados T25 e T90, quando comparadas entre si, apresentaram 71,6% e 81% de identidade para nt e aa, respectivamente (Figura 15 e 16). As análises também foram realizadas para a porção genômica da RBP (ORF 6), sendo as porcentagens obtidas, quando comparadas com outras espécies de carlavírus, inferiores a 58% para nt e aa. Nas comparações da RBP entre os isolados T25 e T90, as porcentagens de identidade foram de 77,8% para nt e 77,9% para aa.

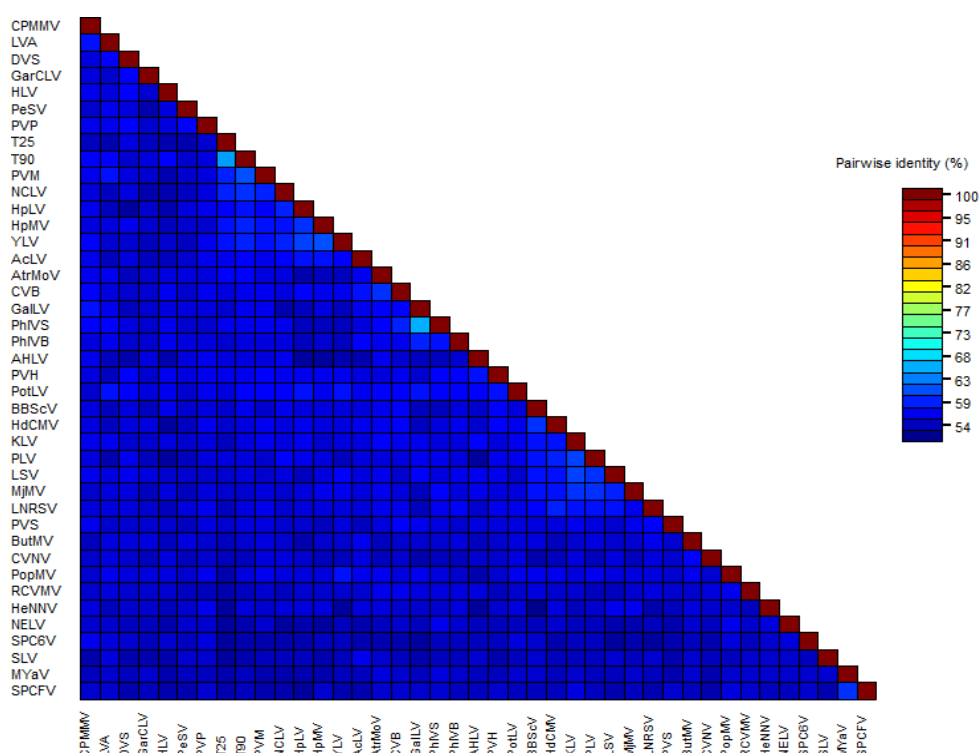


Figura 13: Matriz de identidade de nucleotídeos da ORF1 (replicase) de isolados de carlavírus que possuem sequência completa depositada no *Genbank*. As informações referentes aos isolados utilizados nessas análises constam da Tabela 7.

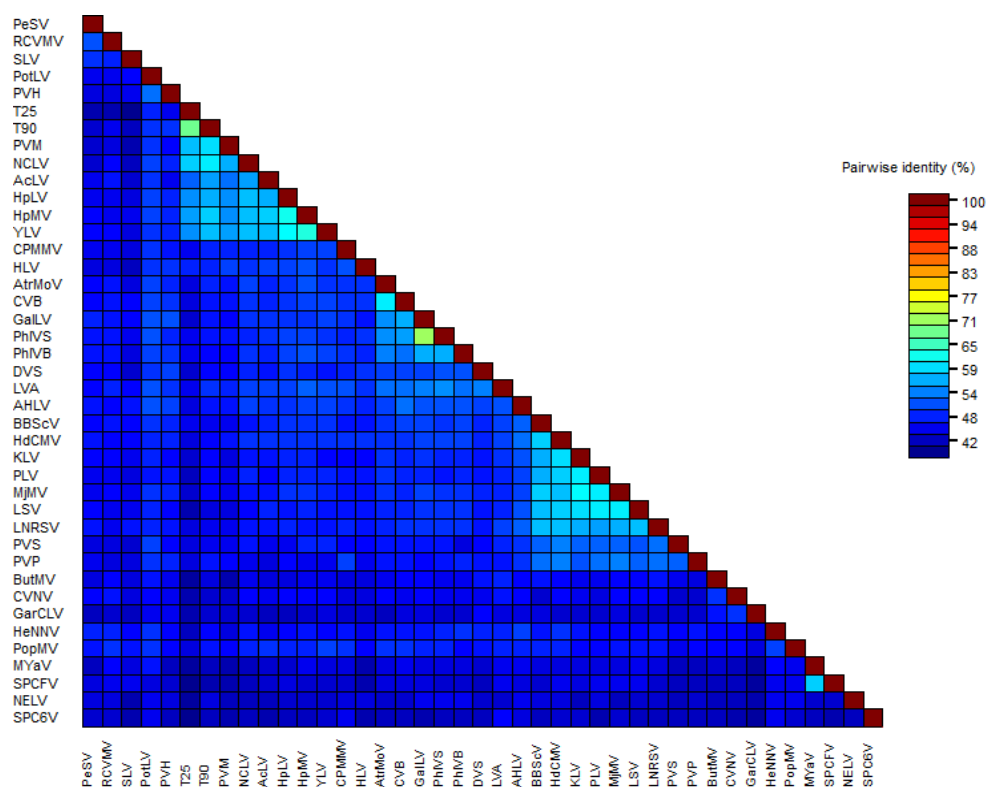


Figura 14: Matriz de identidade de aminoácidos da ORF1 (replicase) de isolados de carlavírus que possuem sequência completa depositada no *Genbank*. As informações referentes aos isolados utilizados nessas análises constam da Tabela 7.

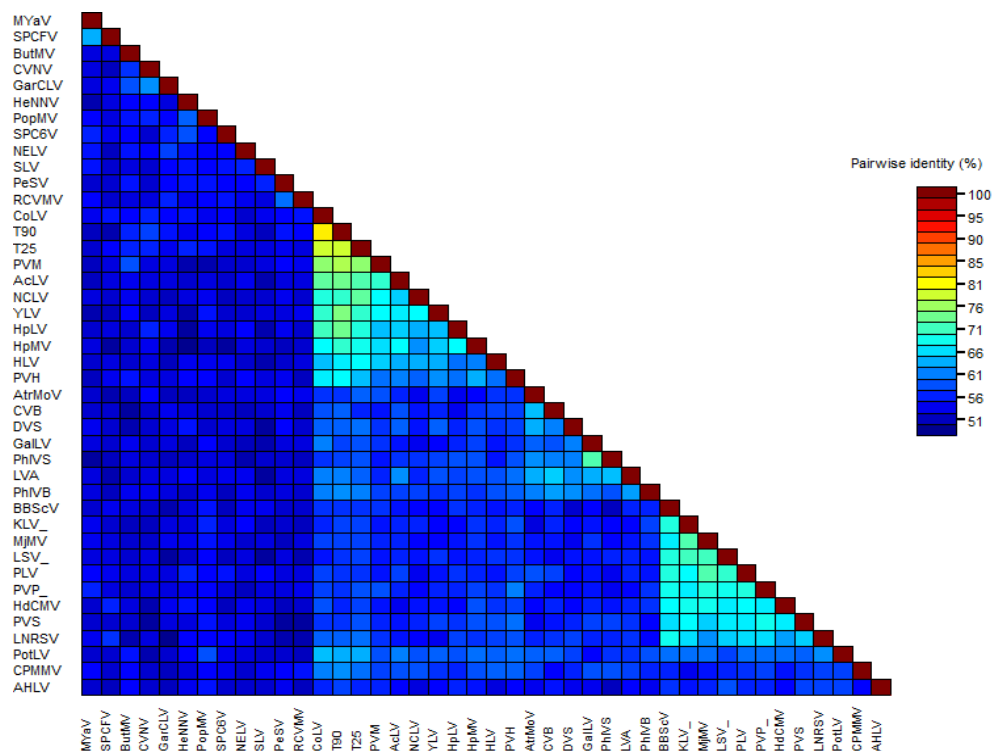


Figura 15: Matriz de identidade de nucleotídeos da ORF 5 (capa proteica) de isolados de carlavírus que possuem sequência completa depositada no *Genbank*. As informações referentes aos isolados utilizados nas análises constam da Tabela 7.

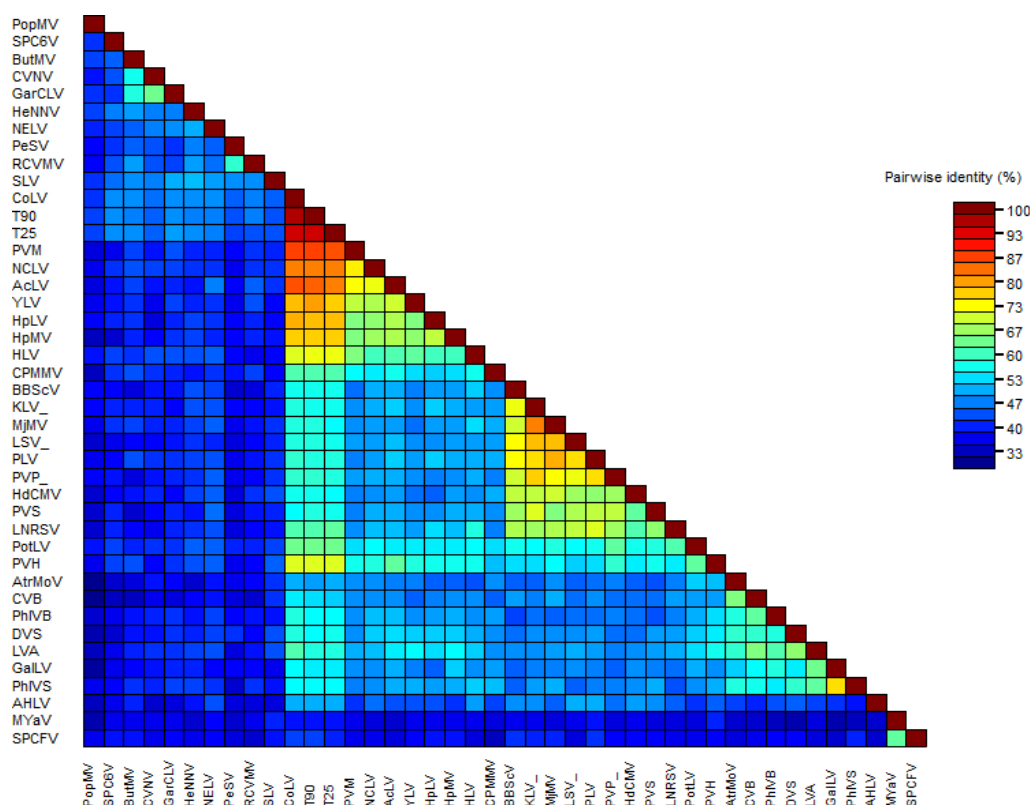


Figura 16: Matriz de identidade de aminoácidos da ORF 5 (capa proteica) de isolados de carlavírus que possuem sequência completa depositada no *Genbank*. As informações referentes aos isolados utilizados nas análises constam da Tabela 7.

Quando realizada a análise filogenética comparativa das porções genômicas referentes à capa proteica e à replicase, em comparação com outras espécies de *Betaflexiviridae*, observou-se que os isolados T25 e T90 formaram um clado distinto, próximo do potato virus M (PVM) (Figuras 17 e 18). Nas análises filogenéticas de nt observou-se um clado formado pelos isolados T25 e T90, compartilhando o mesmo ramo com o isolado tipo de CoLV (AY340584) (Figura 18). Os critérios taxonômicos para a determinação de espécies do gênero *Carlavirus* levam em consideração a identidade de nucleotídeos e aminoácidos da replicase e da capa proteica. Nas análises filogenéticas, confirmou-se que os isolados T25 e T90 pertenciam ao gênero *Carlavirus*, devido ao fato de estarem inseridos no mesmo clado, e pela nítida separação dos membros das duas subfamílias de *Betaflexiviridae*, *Quinvirinae* e *Trivirinae*, observada nas árvores filogenéticas da ORF 1, que codifica a replicase (Figura 17) e da ORF 5, da capa proteica (Figura 18).

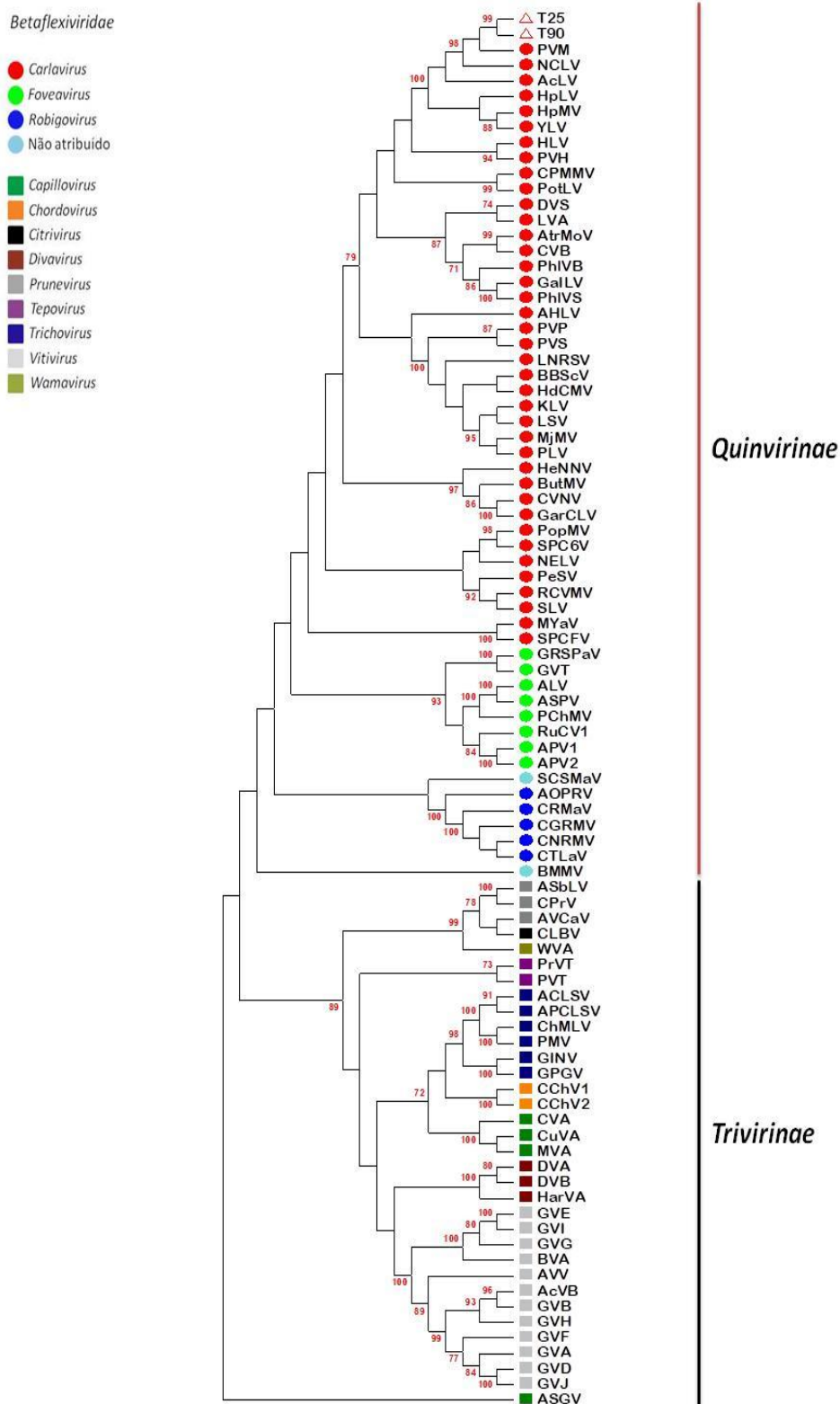


Figura 17: Árvore filogenética de máxima verossimilhança (*bootstrap* para 1500 replicações) obtida a partir do alinhamento múltiplo de sequências completas de nucleotídeos da ORF 1, que codifica a replicase viral, dos isolados T25 e T90 caracterizados neste trabalho (triângulos) e outras espécies membros da família *Betaflexiviridae* (subfamílias *Quinvirinae* e *Trivirinae*). Os códigos de acesso do *GenBank* de cada isolado e respectivos acrônimos constam da Tabela 3.

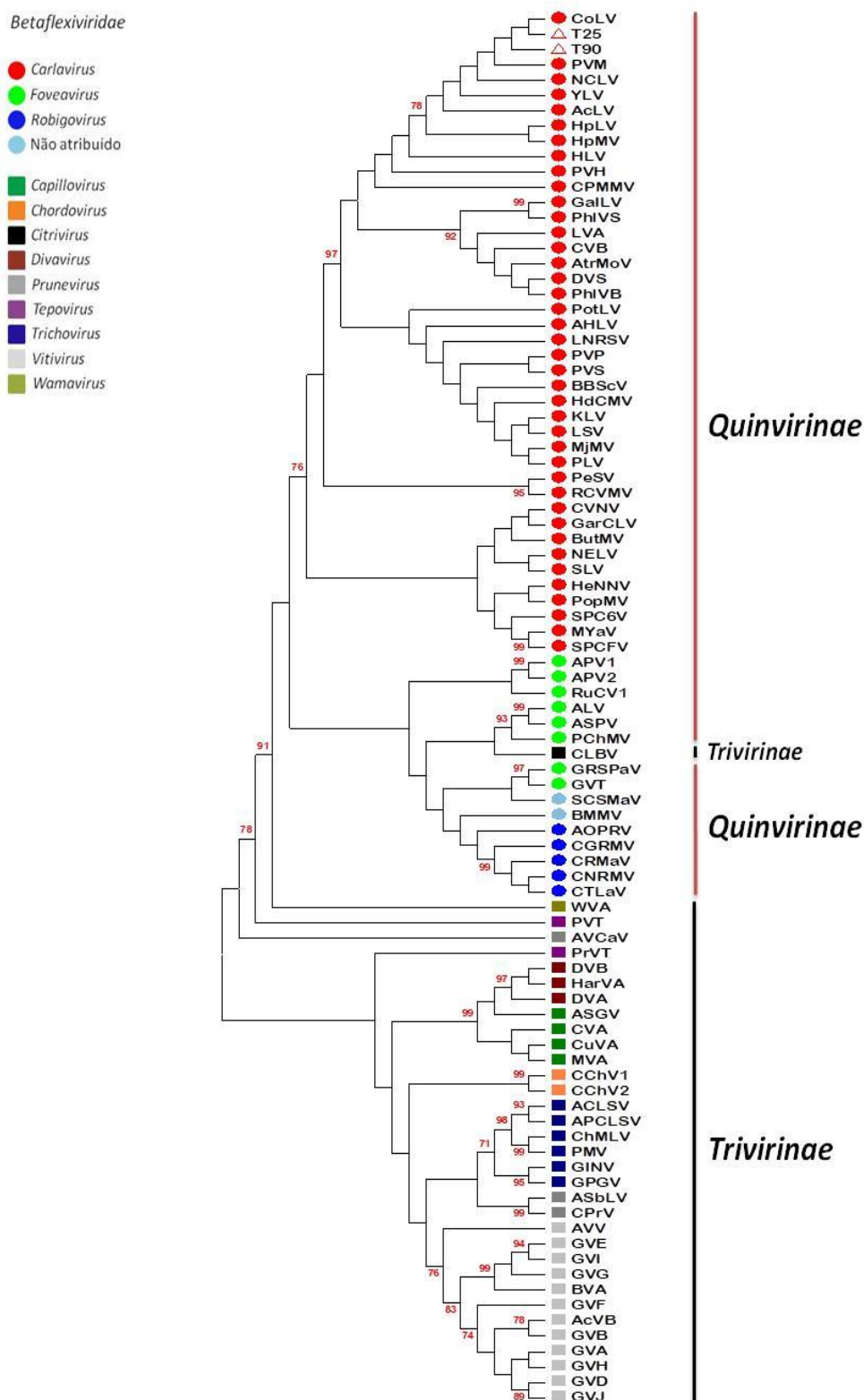


Figura 18: Árvore filogenética de máxima verossimilhança (*bootstrap* para 1500 replicações) obtida a partir do alinhamento múltiplo de seqüências de nucleotídeos da ORF 5, que codifica a capa proteica (CP), de dos isolados T25 e T90 caracterizados neste trabalho (triângulos) e outras espécies da família *Betaflexiviridae* (subfamílias *Quinvirinae* e *Trivirinae*). Os códigos de acesso do *GenBank* de cada isolado e respectivos acrônimos constam da Tabela 3.

6. Discussão

Uma das características dos membros pertencentes do gênero *Carlavirus* é a não indução de sintomas e danos (latência) em suas plantas hospedeiras, mesmo em infecções sistêmicas. Devido ao fato do CoLV, frequentemente, não induzir sintomas e danos em suas hospedeiras e não haver relatos de perdas de produção, poucos estudos foram realizados, até o momento, com relação aos aspectos epidemiológicos e tampouco sobre a influência de sua variabilidade genética na produção de brássicas. Além disso, pouco se sabia sobre a gama de hospedeiras do CoLV, sendo considerado, por alguns autores (BELINTANI *et al.*, 2002) como restrito ou quase restrito a espécies do gênero *Brassica*. Experimentalmente, o CoLV já havia sido relatado infectando *Chenopodium quinoa*, *C. giganteum* (ex *C. amaranticolor*), *Malva parviflora*, rabanete (*Raphanus sativus*), perpétua (*Gomphrena globosa*), nabo (*B. rapa* subsp. *rapa*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), soja (*Glycine max*), melancia (*Citrullus lanatus*), mostarda (*B. rapa*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*) e berinjela (*Solanum melongena*). O CoLV, até então, havia sido relatado em plantações comerciais infectando couve, couve-flor e raiz-forte (*Armoracia rusticana*) (KITAJIMA *et al.*, 1970; COSTA *et al.*, 1972; COSTA *et al.*, 1974; MELLO *et al.*, 1987; BELINTANI *et al.*, 2002; EIRAS *et al.*, 2008).

A avaliação da resposta das variedades comerciais e de plantas hospedeiras frente à infecção de isolados virais de CoLV realizada neste trabalho indicou que houve a expressão de sintomas de mosaico em couve-flor e couve-rábano (Brassicaceae) e mosaico, deformação foliar e atraso no desenvolvimento em *Nicotiana megalosiphon* (Solanaceae). *Solanum melongena*, *Citrullus lanatus* e *Gomphrena globosa* não foram infectadas pelos isolados de CoLV. Esses resultados diferem dos obtidos por Mello e colaboradores (1987) que, ao avaliarem a gama de hospedeiros de um isolado de CoLV por inoculação mecânica em diferentes espécies e variedades botânicas, verificaram que somente 14 das 52 espécies inoculadas foram infectadas. Todas as espécies e variedades da família Brassicaceae foram infectadas de forma sistêmica sem indução de sintomas, assim como as espécies *Citrullus lanatus* (família Cucurbitaceae), *Glycine max*, *Pisum sativum* (família Fabaceae) e *Solanum melongena* (família Solanaceae). Relataram também que CoLV foi capaz de infectar essas espécies de forma sistêmica sem indução de sintomas e com a indução de lesões locais em *Gomphrena globosa* (MELLO *et al.*, 1987).

Os isolados T25 e T90 de carlavírus estudados neste trabalho, assim como já foi descrito em trabalhos anteriores para o CoLV (KITAJIMA *et al.*, 1970; MELLO *et al.*, 1987; BELINTANI *et al.*, 2002), induziram lesões locais em *Chenopodium giganteum*. Apesar dos isolados de CoLV terem induzido sintomas em algumas espécies desafiadas neste trabalho, é importante ressaltar que, na maioria das espécies avaliadas, as infecções transcorreram sem a indução de sintomas, corroborando os resultados obtidos por outros pesquisadores (MELLO *et al.*, 1987; BELINTANI *et al.*, 2002).

A avaliação da gama de hospedeiras realizada neste trabalho também revelou que *N. megalosiphon* pode ser utilizada como hospedeira em experimentos futuros para avaliar outros parâmetros associados à infecção pelo CoLV, pois expressa sintomas como mosaico, deformação foliar e atraso no desenvolvimento, o que ainda não havia sido constatado por outros pesquisadores.

Observações ao MET permitiram constatar que os isolados analisados de CoLV não diferiram das demais espécies de carlavírus descritas. Belintani e Gaspar (2003) também observaram inclusões características de agregados de partículas em feixes paralelos no citoplasma de células infectadas de *C. quinoa*. Gaspar e Costa (1993), ao analisarem amostras de feijoeiro, observaram a presença de partículas do ‘vírus do mosaico angular do feijoeiro’ com 650 nm de comprimento e inclusões citoplasmáticas características com a formação de agregados de partículas virais em feixes paralelos no citoplasma. Zanardo e colaboradores (2017), também observaram em amostras de soja infectada com o cowpea mild mottle virus (CPMMV) uma espécie do gênero *Carlavirus*, partículas com 650 nm de comprimento e inclusões citoplasmáticas típicas de carlavírus no citoplasma das células infectadas. Posteriormente, Belintani e Gaspar (2003) também observaram partículas de um isolado de CoLV e inclusões citoplasmáticas características de carlavírus em plantas de *C. quinoa* infectadas experimentalmente. Esses resultados corroboram os obtidos por Kitajima *et al.* (1970), que demonstraram que as partículas do então “vírus latente da couve”, atualmente CoLV, ficavam confinadas ao citoplasma da célula hospedeira em inclusões citoplasmáticas formadas pela presença de partículas de vírus. Belintani e Gaspar (2003) também concluíram que o sítio de replicação do CoLV ocorre no citoplasma em associação com vesículas membranosas e em presença de inclusões citoplasmáticas, sendo sua presença considerada característica das infecções por isolados virais pertencentes ao gênero *Carlavirus*.

Com o avanço das tecnologias, novas técnicas foram desenvolvidas para facilitar e auxiliar na caracterização dos vírus e ampliar o conhecimento sobre sua estrutura genômica. Badge *et al.* (1996) utilizando um primer denominado Carla-Uni em conjunto com um Oligo dT21, desenhado por Pappu *et al.* (1993), descreveram uma nova espécie de *Carlavirus*, com base em fragmentos de 120 pb. Belintani e Gaspar (2002) ao utilizarem esses primers em conjunto com cDNA específico de CoLV obtiveram um fragmento de 116 nucleotídeos que apresentou 62% de homologia com o potato virus M (PVM).

Oligonucleotídeos (primers) similares foram utilizados para a detecção do CoLV, por RT-PCR, nas amostras de brássicas analisadas, fato que permitiu constatar que podem ser utilizados para a detecção do CoLV, uma vez que as análises de identidade de nucleotídeos de todos os isolados avaliados, quando comparados com a sequência obtida por Belintani e Gaspar (2003), tiveram valores de identidade superiores a 90%. O mesmo resultado foi obtido quando foi utilizado primer Carla-CP desenvolvido em conjunto com o primer Oligo dT21, que possibilitam a amplificação de fragmento de 940 pb (GASPAR *et al.*, 2008).

Os critérios taxonômicos para a determinação de espécies do gênero *Carlavirus* consideram as porcentagens de identidade de nucleotídeos e aminoácidos da replicase ou da capa proteica como um fator primordial. Isolados de carlavírus são considerados pertencentes a uma mesma espécie, quando compartilharem mais de 72% de identidade de nucleotídeos ou, no mínimo, 80% de identidade de aminoácidos das porções genômicas referentes à capa proteica e à replicase (ICTV *online* - <https://talk.ictvonline.org/>).

A partir do sequenciamento dos genomas completos, via sequenciamento de alto rendimento, foi confirmada a identidade dos isolados T25 e T90 como pertencentes ao gênero *Carlavirus*, bem como também por compartilharem características genômicas com as demais espécies pertencentes a esse gênero: RNA de fita simples poliadenilado no terminal 3', presença do triplo bloco gênico e presença de uma sexta ORF, que codifica uma proteína (11 kDa) rica em cisteína com motivos de ligação a ácidos nucleicos (ADAMS *et al.*, 2004). Além dessas características, também foi identificada a presença de uma peptidase (*papain-like protease*) envolvida na autoproteólise da poliproteína replicase (ORF 1), já descrita anteriormente para outras espécies de *Carlavirus* (TAVANTZIS, 1991; HATAYA *et al.*, 2000; SCOTT e ZIMMERMAN, 2008; ZANARDO *et al.*, 2014a; WANG *et al.*, 2018).

Com as análises das porcentagens de identidade e similaridade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos da ORF 1 (replicase), dos isolados T25 e T90, com valores

inferiores a 72% para nucleotídeos e aminoácidos, foi pressuposto que estes isolados poderiam ser espécies distintas. Porém, as análises realizadas com base na porção genômica da capa proteica destes isolados indicaram 81% de identidade para aminoácidos e 71,6% de identidade de nucleotídeos. Portanto, esses isolados devem pertencer à mesma espécie. Além disso, a identidade desses isolados foi confirmada por meio de análises filogenéticas que indicaram a formação de um clado, distinto quando comparados com outras espécies pertencentes a gêneros distintos da família *Betaflexiviridae*.

Com base nos critérios taxonômicos, novas espécies de carlavírus foram propostas por Cohen *et al.* (2000), Igori *et al.* (2016) e mais recentemente por Wang *et al.* (2018), que descreveram, respectivamente, *Ligustrum virus A*, *Aconitium latent virus* e *Chrysanthemum virus R* (espécie ainda não aceita pelo ICTV). Da Silva *et al.* (2019), ao realizarem sequenciamento de alto rendimento (HTS), obtiveram a sequência completa de um genoma viral em plantas de alho denominado, provisoriamente, garlic yellow mosaic-associated virus (GYMaV). Nas análises de identidade realizadas, comparando a porção genômica referente à replicase com membros da família *Betaflexiviridae*, constatou-se que as porcentagens ficara entre 55% (gênero *Tepovirus*) e 56% (gênero *Robigovirus*). Quando os autores compararam a porção genômica referente a CP, foram obtidas porcentagens entre 61% a 64% de identidade com membros do gênero *Foveavirus*. Os valores de porcentagem de identidade de nucleotídeos para que se possa considerar um novo gênero, segundo o ICTV, devem ficar abaixo de 45%. No entanto, as análises filogenéticas e de cofilogenia indicaram que, apesar de se agrupar com outros vírus, o GYMaV formou uma linhagem evolutiva independente dentro da família *Betaflexiviridae*. Vale ressaltar que Belintani *et al.* (2002) obtiveram uma sequência parcial de 1040 nucleotídeos do terminal 3' do CoLV, que foi depositada no *Genbank* (AY340584) que, apesar de não haver qualquer sequência do genoma completo desse vírus, o ICTV aceitou como sendo uma espécie definitiva do gênero *Carlavirus*. Naquela ocasião, uma série de informações biológicas, sorológicas e elétrono-microscópicas que já havia na literatura sustentaram a inclusão do CoLV como espécie definitiva de carlavírus (KITAJIMA *et al.*, 1970; MELLO *et al.*, 1987; BELINTANI *et al.*, 2002).

Considerando a porcentagem de similaridade de aminoácidos e os resultados obtidos nas análises filogenéticas da capa proteica e da replicase, foi possível concluir que os isolados T25 e T90 podem ser mantidos como pertencentes à espécie *Cole latent virus*. Para a realização de análises de recombinação de isolados do CoLV, é necessária a obtenção e inclusão de sequências genômicas (parciais ou completas) de novos isolados, quando então

será possível determinar a ocorrência de eventos de recombinação da porção genômica da replicase e de outras porções genômicas desse vírus. Eventos de recombinação da porção genômica da replicase podem ser frequentes em membros do gênero *Carlavirus* (SINGH *et al.*, 2012; ZANARDO *et al.*, 2014a). Singh e colaboradores (2012), ao realizarem análises de recombinação de cinco sequências de chrysanthemum virus B (CVB), identificaram recombinantes, com evidências de recombinações ocorridas a partir de um evento único. Estes mesmos autores constataram também que, possivelmente, quatro eventos de recombinação ocorreram entre isolados de CVB e espécies distantes relacionadas aos carlavírus, estirpes divergentes ou espécies não descritas como CVB. Os autores verificaram que nas análises da porção genômica da ORF 5 (que codifica a CP), houve um evento único de recombinação, sugerindo que em genes que codificam para proteínas estruturais as recombinações tendem a ser mais restritas. Além disso, também constataram que a ORF 6 (*RNA-Binding Protein*, RBP) apresenta maior grau de conservação (SINGH *et al.*, 2012). Zanardo *et al.* (2014a), ao compararem a porção genômica da ORF 1 (que codifica a replicase viral) de seis isolados brasileiros de cowpea mild mottle virus com outros isolados de Gana, verificaram que as porcentagens de identidade variaram de 60 a 61% para nt e 58% a 61% para aa. Quando comparada a ORF 5, as porcentagens de identidade foram de 79% para nt e 95% para aa, indicando que os isolados brasileiros e de Gana pertencem à mesma espécie. A partir dos resultados obtidos, os autores sugeriram que apenas uma das ORFs, CP ou replicase, deveria ser utilizada para a classificação taxonômica das espécies do gênero *Carlavirus*, sendo a CP considerada a mais apropriada. Porém, esta característica, ainda não foi avaliada para isolados de CoLV.

Neste trabalho, foi possível obter as sequências completas dos genomas de dois isolados de carlavírus de couve (T25 e T90), que tiveram suas identidades confirmadas como pertencentes à espécie *Cole latent virus*. Vale ressaltar que até o presente momento, o CoLV tem sua ocorrência natural restrita a espécies de brássicas cultivadas no Brasil. Foi possível obter também mais informações com relação à gama de hospedeiros do CoLV, sendo identificada uma nova hospedeira experimental, *Nicotiana megalosiphon*, que expressa sintomas bastante evidentes quando infectada pelo CoLV, e que poderá ser utilizada em experimentos futuros envolvendo aspectos das interações vírus-hospedeiro. Testes de transmissão por diferentes espécies de afídeos, avaliação da suscetibilidade de espécies da vegetação espontânea aos isolados de CoLV, principalmente da família Brassicaceae, além de experimentos para se avaliar a importância da temperatura na expressão de sintomas e

experimentos de interação entre o CoLV e o TuMV, ainda precisam ser realizados para se conhecer outros aspectos da patologia, biologia e epidemiologia desse carlavírus genuinamente brasileiro.

7. Conclusões

1. As avaliações da gama de hospedeiros dos isolados T25 e T90 confirmaram que as infecções virais, na maioria dos casos, transcorrem sem a indução de sintomas na planta. No entanto, ocasionalmente, isolados de CoLV podem induzir sintomas em variedades comerciais de brássicas e em plantas indicadoras;
2. Com as análises das sequências, organizações genômicas e filogenia confirmou-se que os dois isolados (T25 e T90) pertencem ao gênero *Carlavirus*;
3. As análises biológicas e moleculares, principalmente envolvendo cálculos para comparação dos valores de porcentagens de identidade das porções genômicas correspondentes à replicase e à capa proteica com outros carlavírus, confirmaram que os dois isolados (T25 e T90) pertencem à espécie *Cole latent virus*;
4. Análises de porcentagem de identidade das sequências obtidas por RT-PCR de 120 pb e 940 pb (regiões que correspondem ao terminal 3' do genoma dos carlavírus), entre os isolados de carlavírus avaliados, indicam que pertencem todos à espécie *Cole latent virus*;
5. *Nicotiana megalosiphon* comportou-se como uma hospedeira diferencial, que pode ser empregada para distinguir isolados de CoLV dos demais vírus que infectam brássicas;
6. Na indisponibilidade de métodos sorológicos ou moleculares para a detecção do CoLV, *N. megalosiphon* pode ser utilizada como hospedeira, em testes de inoculação experimental, para a confirmação da presença do vírus em plantas assintomáticas de brássicas;
7. Apesar da grande distância geográfica entre os locais de onde os isolados T25 (SP) e T90 (AL) foram coletados, observou-se elevada similaridade e compartilham o mesmo clado nas análises filogenéticas;

8. Diante do levantamento e análises realizadas, constatou-se que o CoLV encontra-se disseminado em áreas de cultivo de brássicas no Brasil;
9. Este é o primeiro registro de sequências completas do genoma do *Cole latent virus*, espécie de *Carlavirus* descrita exclusivamente em brássicas no Brasil.

8. Referências Bibliográficas

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A.A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G.D.; MARTELLI, G.P.; MILNE, R.G.; FAUQUET, C.M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, v. 149, p. 1045-1060, 2004.

AGRIANUAL, 2013. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP, 480p.

AGRIANUAL, 2017. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP.

ANISIMOVA, M.; GIL, M.; DUFAYARD, J.F.; DESSIMOZ, C.; GASCUEL, O. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power and robustness of fast Likelihood-based approximation schemes. **Systematic Biology**, v.60, p. 685-699, 2011.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS 2016. Editora Gazeta Santa Cruz do Sul. p. 28, 2016.

ÁVILA, A.C; INOUE-NAGATA, A.K; NEVES, F.M; MATOS, L.G; DIAS, R.C.S; RANGEL, M & NAGATA, T. Produção de anti-soro e detecção por DAS-ELISA do Melon yellowing-associated virus em meloeiro. **Tropical Plant Pathology**, vol. 33, 3, 245-247, 2008.

BADGE, J.A.; BRUNT, R.; CARSON, E.; DAGLESS, M.; KARAMAGIOLI, S.; PHILLIPS, S.; SEAL, R.; TURNER, G. D.; FOSTER. A carlavirus specific PCR primer and partial nucleotide sequence provides further evidence for the recognition of cowpea mild mottle virus as a whitefly-transmitted carlavirus. **Eur. J. Plant Pathology**. 102, 305–310, 1996.

BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. **Bacteriological Reviews**, v.35, n.3, p. 235–241, 1971.

BELINTANI, P.; GASPAR, J.O.; TARGON, M.L.P.N & MACHADO, M.A. Evidence Supporting the Recognition of Cole latent virus as a Distinct Carlavirus. **Journal of Phytopathology**, v.150, p. 330-333, 2002.

BELINTANI, P. & GASPAR, J.O. Coat protein and RNAs of *Cole latent virus* are not present within chloroplasts of *Chenopodium quinoa* infected cells. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.84-88, 2003.

BESERRA Jr., J.E.A.; CARVALHO, M. G.; BARGUILL, M.; ZERBINI, M.F. Partial genome sequence of a Potyvirus and of a virus in the order *Tymovirales* found in *Senna macranthera* in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, vol. 36, 2, 116-120, 2011.

BRAGARD, C.; CACIAGLI, P.; LEMAIRE, O.; LOPEZ-MOYA, J.J.; MACFARLANE, S.; PETERS, D.; SUSI, P.; TORRANCE, L. Status and Prospects of Plant Virus Control Through Interference with Vector Transmission. **Annu. Rev. Phytopathol.** 51:177–201, 2013.

BRIGHENTI & OLIVEIRA. Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA, R.S Jr. *et al.* (Eds). Biologia e Manejo de plantas daninhas. p. 1-36, 2011.

BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L. Viruses of Plants: Descriptions and Lists from the VIDE Database. New York, 435-436, 1997.

CAMARGO FILHO, W.P.; CAMARGO, F.C. Acomodação da produção olerícola no Brasil e em São Paulo, 1990-2010. Análise, Perspectiva e Tendências 2015. Instituto de Economia Agrícola, 2010. Disponível em:<<http://www.abhorticultura.com.br>>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p. 475-483, 1977.

CLARK, M.F.; LISTER, R.M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. In: Weissbach A, Weissbach HW (eds) Methods in enzymology. **Academic Press, London**, v.118, pp. 742–766, 1986.

COHEN, J.; ZEIDAN, M.; ROSNER, A.; GERA, A. Biological and molecular characterization of a new carlavirus from *Aconitum* sp. **Phytopathology**, v.90, p. 340-344, 2000.

COLARICCIO, A; EIRAS, M; VICENTE, M; CHAGAS, C.M; HARAKAVA, R. Caracterização parcial de um isolado do vírus do mosaico do pepino de Musa sp. “nanicão”. **Fitopatologia Brasileira**, 21, 238-274, 1996.

CONAB PROHORT. Programa brasileiro de modernização do mercado hortigranjeiro. Disponível em: <http://dw.prohort.conab.gov.br/pentaho/Prohort>. Acesso em: 30 de novembro de 2016.

COOPER, I.; JONES, R.A.C. Wild plants and viruses: Under-investigated ecosystems. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 1-47, 2006.

COSTA, A.S.; GASPAR, J.O.; VEGA, J. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um vírus do grupo S transmitido por mosca branca. **I Seminário sobre pragas e doenças do feijoeiro**. Instituto Biológico, Campinas, SP, 1980.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, C. L.; NAGAI, H. A couve comum como fonte de tres virus que afetam crucíferas. **Rev. de Olericultura**, v. 12, p. 82-82, 1972.

COSTA, C.L.; CUPERTINO, F.P.; KITAJIMA, E.W.; MATTOS, J.K. Ocorrência de vírus de crucíferas e compostas hortícolas no Distrito Federal. **Fitopatologia (Lima)**, v.9, p. 49-49, 1974.

CHAVES, A.L.R. Vírus. In: EIRAS, M; GALLETI, S.R (Eds). Técnicas de diagnóstico de fitopatógenos. São Paulo: Devir Livraria, p.155-179, 2012.

CHRISTIE, R.G. & EDWARDSON, J.R. Light and electronmicroscopy of plant virus inclusions. Gainesville: Florida Agricultural Experiment Station, 155p, 1977. (Monograph series, n. 9).

CUPERTINO, F.P; ÁVILA, A.C. de; ARAÚJO, M.T; MALUF, W.R. Fontes de resistência ao vírus de vira-cabeça em *Lycopersicon*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 11:330-331, 1986.

DÁDER, B.; THEN, C.; BERTHELOT, E.; DUCOUSSO, M.; NG, J.C.K.; DRUCKER, M. Insect transmission of plant viroses: multilayered interactions optimize viral propagation. **Insect Science**, v.24, p. 929-949, 2017.

DANIELS, J.; CALDAS, L.S.; KITAJIMA, E.W. Plantas de alho (*Allium sativum*) supostamente sadias, obtidas de meristemas de bulbilhos infetados por vírus. **Fitopatologia Brasileira**, v.3, p.82, 1978.

DA SILVA, L.A.; OLIVEIRA, A.S.; MELO, F.L.; ARDISSON-ARAÚJO, D.M.P.; RESENDE, B.M. A new virus found in garlic virus complex is a member of possible novel genus of the family *Betaflexiviridae* (order *Tymovirales*). **PeerJ**, 7: e6285, 2019.

DELGADO, G. C.; BERGAMASCO, S. (Org.). **Agricultura familiar brasileira: desafios e perspectivas de futuro**. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2017.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, n.4, p. 19-21, 1983.

DUSI, A.N.; FAJARDO, T.V. M.; CUPERTINO, F.P. Serological Identification of Garlic (*Allium sativum* L.) Viruses in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. 19: 298, 1994.

EIGENBRODE, S.D.; BOSQUE-PÉREZ, N.A.; DAVIS, T.S. Insect-borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 63, p.169-191, 2018.

EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M. Primeiro relato do *Cole latent virus* em raiz-forte. **Tropical Plant Pathology**. 33(supl): S290, 2008.

FAJARDO, T.V.M.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Garlic viral complex: identification of potyviruses and carlavirus in central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. 26: 619, 2001.

FAULIN, E.J.; AZEVEDO, P.F. Distribuição de hortaliças na agricultura familiar: uma análise das transações. **Informações Econômicas**, v.33, p.24-37, 2003.

FAYAD-ANDRÉ, M.S.; DUSI, A.N.; RESENDE, R.O. Spread of viruses in garlic fields cultivated under different agricultural production systems in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. 36: 341, 2011.

FOSTER, G.D. The structure and expression of the genome of carlaviruses. **Res. Virol**, 143: 103-112, 1992.

FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G. & HATTA, T. Carlavirusgroup. In: FRANCKI, R.I.B.; MILNE, R.G. & HATTA, T.(Eds.). Atlas of plant viruses. Boca Raton, **C.R.C.Press**, p. 173-182, 1985.

GAMA, M.I.C.; KITAJIMA, E.W.; ÁVILA, A.C.; LIN, M.T. Um Carlavirus em Seringueira (*Hevea brasiliensis*). **Fitopatologia Brasileira**. 8: 621,1983.

GASPAR, J.O.; BELINTANI, P.; ALMEIDA, A.M.R.; KITAJIMA, E.W. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. **Journal of Virological Methods**, 148:283–285, 2008.

GASPAR, J.O.; COSTA, A.S. Vírus do mosaico angular do feijoeiro: purificação e ultraestrutura dos tecidos infectados. **Fitopatologia Brasileira**, 18: 534-540, 1993.

GALLET, R.; MICHALAKIS, Y.; BLANC, S. Vector-transmission of plant viruses and constraints imposed by virus interactions. **Current Opinion in Virology**, 33:144-150, 2018.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920 p.

GUINDON, S.; DUFAYARD, JF.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v.59, p.307-321, 2010.

HATAYA, T.; UCHINO, K.; ARIMOTO, R.; SUDA, N.; SANO, T.; SHIKATA, E.; UYEDA, I. Molecular characterization of *Hop latent virus* and phylogenetic relationship among viruses closely related to calaviruses. **Archives of Virology**, 145:2503-2524, 2000.

HULL, R. **Plant Virology**. 5th Ed., San Diego, CA.: Academic Press, 2014. 1118p.

ICTV, 2019. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em:<https://talk.ictvonline.org/> Acesso em 24 de abril de 2019.

IGNÁCIO, S.A. Importância da estatística para o processo de conhecimento e tomada de decisão. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, Curitiba,n.118, p.175-192, 2010.

IGORI, D.; LIM, S.; ZHAO, F.; BAEK, D.; PARK, J.M.; CHO, H.S.; KIM, H.S.; KWON, S.Y.; MOON, J.S. The complete sequence and genome organization of ligustrum virus A, a novel carlavirus. **Archives of Virology**, v. 161, p. 3593-3596, 2016.

JEYANANDARAJAH, P.; BRUNT, A.A. The natural occurrence, transmission, properties and possible affinities of Cowpea mild mottle virus. **Journal of Phytopathology**, 137, p. 148-156, 1993.

KATO, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**. v.30, p.772-780, 2013.

KITAJIMA, E.W.; CAMARGO, I.J.; COSTA, A.S.B. Morfologia e aspectos intracelulares do vírus latente da couve. **Bragantia**, v. 29, n° único, p.181-190, 1970.

KITAJIMA, E.W. & NOME, C.F. Microscopia eletrônica em virologia vegetal. In: Docampo, D.M. & Lenardón, S.L. (Eds.) Métodos para detectar patógenos sistêmicos. Córdoba, IFFIVE/INTA-JICA pp.59-87. 1999.

KITAJIMA, E.W. Microscopia eletrônica. In: ALMEIDA, A.M.R. & LIMA, J.A.A (Eds.) Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia. Sociedade Brasileira de Fitopatologia: Fortaleza, CE. p.141-150, 2001.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Mega7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. 30: 2725-2729.

LAWRENCE, D.M.; ROZANOV, M.N.; HILLMAN, B.I. Autocatalytic Processing of the 223 – kDa protein of Blueberry Scorch Carlavirus by a Papain-like Protease. **Virology**, 207:127-135, 1995.

LIMA N, V.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MAY, L.L.; RUARO, L. Evidência experimental de que o vírus do mosaico da cassia é transmitido por vetor aéreo. **Fitopatologia Brasileira**. 16: LII, 1991.

LIMA, M.F.; NAGATA, T.; NEVES, F.M.; INOUE-NAGATA, A.K.; MOITA, A.C.; SOUSA, C.; DELLA VECCHIA, M.; RANGEL, M.G.; DIAS, R.C.S.; DUTRA, L.D.; de ÁVILA, A.C. Occurrence of *Melon yellowing-associated virus* (MYaV) in melon producing areas of brazilian northeast. **Tropical Plant Pathology**. 34(supl) S278, 2009.

LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; CUPERTINO, F.P.; COSTA, C.L. Properties of a possible carlavirus isolated from a cerrado native plant *Cassia sylvestris*. **Plant. Dis. Rep.** 63: 501-505, 1979.

LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; COSTA, L. Association of *Cassia mild mosaic virus* with Dieback of *Cassia macranthera* in central Brazil. **Plant Dis. Rep.** 64: 587, 1980.

MADEIRA, N.R.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; GIORDANO, L.B. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.428-432, 2008.

MARTELLI, G.P. & RUSSO, M. The use of thin sectioning for visualization and identification of plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. & KOPROWSK, H (Eds.). Methods in virology. New York: **Academic Press**, p.143-192, 1984

MELO, A.M.T.; ARAGÃO, F.A.S. Melhoramento de Hortaliças no Brasil. In: NICK, C; BOREM, A.(Ed) Melhoramento de hortaliças. 1ed. Viçosa: Editora UFV, v.1, 9-60, 2016.

MELO, R.A.C.; LUENGO, R.F.A.; JÚNIOR, A.D.C.; BUTRUILLE, N.M.S. Caracterização da produção de couve do Distrito Federal. Brasília: Embrapa Hortaliças (Embrapa Hortaliças, Documentos 155), 2017.

MELLO, S.C. M.; CUPERTINO, F.P.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. Propriedades biológicas e microscopia eletrônica do vírus latente da couve. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.353-360, 1987.

MICHELOTTO, M.D.; BUSOLI, A. C. Características da transmissão do vírus do mosaico-das-nervuras do algodoeiro pelo pulgão *Aphis gossypii* com relação à persistência e ao tempo necessário para inoculação. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.3, p.441-447, 2007.

MITUTI, T. Levantamento das principais viroses na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e caracterização de Carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil. Dissertação de Mestrado, IAC, 2009.

NAGAHARU, U. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. **Japan. J. Bot.**, v.7, p.389-452, 1935.

NAGATA, T.; ALVES, D.M.T.; INOUE-NAGATA, A.K.; TIAN, T.Y.; KITAJIMA, E.W.; CARDOSO, J.E.; AVILA, A.C. A novel flexivirus transmitted by whitefly. **Archives of Virology**, v.150, p. 379-387, 2005.

NICAISE, V. Boosting innate immunity to sustainably control diseases crops. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p.112-119, 2017.

NUNES, S. P. O Desenvolvimento da Agricultura Brasileira e Mundial e a Idéia de Desenvolvimento Rural. Disponível em: <<http://www.deser.org.br/documentos/doc/DesenvolvimentoRural.pdf>> Acesso em: 25 de abril de 2017.

PASQUAL, M.; DUTRA, L.F.; ARAÚJO, A.G.; PEREIRA, A.R. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA J.E (Ed.) Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, EMBRAPA. p.61-161, 2010.

PALLET, D.W.; THURSTON, M.I.; CORTINA-BORJA, M.; EDWARDS, M.L.; ALEXANDER, M.; MITCHELL, E.; RAYBOULD, A.F.; COOPER, J.I. The incidence of viruses in wild *Brassica rapa* ssp. *Sylvestris* in southern England. **Ann. appl. Biol**, 141:163-170, 2002.

PAPPU, S.S.; BRAND, R.; PAPPU, H.R.; RYBICKI, E.P.; GOUGH, K.H.; FRENKEL, M.J.; NIBLETT, C.L. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification of dasheen mosaic virus. **Journal of Virological Methods**, 41: 9-20, 1993.

PICOLOTTO, E. L. Os atores da construção da categoria agricultura familiar no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 1, p. 63-84, 2015.

PORTAL BRASIL. Agricultura familiar produz 70% dos alimentos consumidos por brasileiro. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/07/agricultura-familiar-produz-70-dos-alimentos-consumidos-por-brasileiro>. Acesso em: 26 de junho de 2017.

REVERS, F.; NICAISE, V. **Plant resistance to infection by viruses**. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. p. 1-10. 2014.

RODRIGUES, L.K. Turnip mosaic virus: levantamento, identificação, caracterização biológica e molecular e aspectos epidemiológicos dos isolados brasileiros que infectam brássicas. Tese de Doutorado. Instituto Biológico, São Paulo, SP, 2019. 165 p.

RODRIGUES, L.K.; CHAVES, A.L.R.; BRUNELLI, K.R.; HAKAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; WALSH, J.W.; EIRAS, M. *Turnip mosaic virus* infecting chinese cabbage in the state of São Paulo: Genetic diversity and incidence. In: XXVI Congresso Brasileiro de Virologia e X Encontro de Virologia do Mercosul, 2015.

RODRIGUES, L.K.; CHAVES, A.L.R.; DAMATTO JUNIOR, E.R.; EIRAS, M. Epidemiological aspects of the transmission and management of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in a passion fruit orchard. **Journal of Plant Pathology**, v.98, n.3, p.531-539, 2016.

SALAS, F.J.S.; CHAVES, A.L.R.; GONÇALVES, M.C.; EIRAS, M.; BARRADAS, M.M. **Princípios de vírus em plantas**. In: SCHERWINSKI-PEREIRA J.E (Ed.) Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília: EMBRAPA. p. 347, 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, A.A.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C.; OLIVEIRA, J.N.; CARDOSO, J.W. Transmissão do amarelão do meloeiro através da mosca-branca (*Bemisia argentifolii*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, Suplemento, p. 211, 2002.

SATO, S.G.; MARTINS, S.S.; CARVALHO, Y.M.C.; MILANIS, A.A.; CUNHAS, R.P. Uma abordagem sobre a comercialização de hortaliças produzidas na região do alto tietê. **Informações Econômicas**, v.38, p.36-45, 2008.

SAUNDERS, K; LUCY, A.P; COVEY, S.N. Susceptibility of Brassica species to cauliflower mosaic virus infection is related to a specific stage in the virus multiplication cycle. **Journal of General Virology**, 71 (8):1641-1647, 1990.

SEABRA, P.V.; RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L.; GALLET, S.R.; ALEXANDRE, M.A. Detecção de *Carlavirus* em *Senna macranthera*. **Rev. Bras. Hortic. Ornam**, Campinas, v.7, n.1, p. 67-71, 2001.

SCOTT, S.W.; ZIMMERMAN, M.T. The complete sequence of ligustrum necrotic ringspot virus, a novel carlavirus. **Archives of Virology**, 153:393-396, 2008.

SIDDELL, S.G.; WALKER, P.J; LEFKOWITZ, E.J.; MUSHEGIAN, A.R.; AGAMS, M.J.; DUTILH, B.E.; GORBALENYA, A.E.; HARRACH, B.; HARRISON, R.L.; JUNGLEN, S.; KNOWLES, N.J.; KROPINSKI, A.M.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J.H.; NIBERT, M.; RUBINO, L.; SABANADZOVIC, S.; SANFAÇON, H.; SIMMONDS, P.; VARSANI, A.; ZERBINI, F.M.; DAVISON, A.J. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). **Archives of Virology**, 2019, v.164, p. 943 [doi:10.1007/s00705-018-04136-2].

SILVA, J. R da.; JESUS, P. de. Os desafios do novo rural e as perspectivas da agricultura familiar no Brasil. Disponível em: <<http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/1407/457>> Acesso em: 05 de abril de 2017.

SINGH, L.; HALLAN, V.; MARTIN, D.; RAM, R.; ZAIDI, A. Genomic sequence analysis of four new *Chrysanthemum virus B* isolates: evidence of RNA recombination. **Archives of Virology**, 157: 531-537, 2012.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª ed., Instituto Plantarum, Nova Odessa.

SHATTUCK, V.I. The Biology, Epidemiology, and Control of Turnip Mosaic Virus. **Horticultural Reviews**, v.14, p.199-238, 1992.

STEVENS, M.; MCGRANN, G.; CLARK, B. *Turnip yellows virus* (syn. *Beet western yellows virus*): an emerging threat to European oilseed rape production? **Research Review**, v.69, p.1-38, 2008.

TAVANTZIS, S.M. Coat protein and protease activity as *in vitro* translation products of *Potato carlavirus M*. **Archives of Virology**, 120:241-252, 1991.

TOMLINSON, J.A. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. **Association of Applied Biologists**. 110, 661-681, 1987.

VALLI, A.A.; GALLO, A.; RODAMILANS, B.; LÓPEZ-MOYA, J.J.; GARCÍA, J.A. The HCPro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. **Molecular Plant Pathology**, v.19, p.744-763, 2018.

VILELA, N.J.; HENZ, G.P. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro e perspectivas futuras. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.17, n.1, p.71-89, jan./abr, 2000.

VIRALZONE. Bioinformatics Resource Portal. Positive Strand RNA Viruses. 2015. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/268?outline=all_by_species>. Acesso em: em 10 de setembro de 2018.

WALSH, J.A.; JENNER, C.E. *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p. 289-300, 2002.

WANG, R.; DONG, J.; WANG, Z.; ZHOU, T.; LI, Y.; DING, W. Complete nucleotide sequence of a new carlavirus in chrysanthemums in China. **Archives of Virology**, v. 163, p. 1973-1976, 2018.

WHITFIELD, A.E.; FALK, B.W.; ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology**, v.479, p.278-289, 2015.

ZANARDO, L.G.; SILVA, F.N.; BICALHO, A.C.; URQUIZA, G.P.C.; LIMA, A.T.M.; ALMDEIDA, A.M.R.; ZERBINI, F.M.; CARVALHO, C.M. Molecular and biological

characterization of *Cowpea mild mottle virus* isolates infecting soybean in Brazil and evidence of recombination. **Plant Pathology**, 63: 456-465, 2014a.

ZANARDO, L.G.; CARVALHO, C.M. *Cowpea mild mottle virus* (*Carlavirus*, *Betaflexiviridae*): a review. **Tropical Plant Pathology**, 42: 417-430, 2017.

ZHOU, J.S.; DRUKER, M.; NG, J.C.K. Direct and indirect influences of virus-insect vector-plant interactions on non-circulative, semipersistent virus transmission. **Current Opinion in Plant Virology**, v. 33, p. 129-136, 2018.