

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

Turnip mosaic virus: levantamento, identificação, caracterização biológica e molecular e aspectos epidemiológicos dos isolados brasileiros que infectam brássicas

Leilane Karam Rodrigues

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

São Paulo

2019

Leilane Karam Rodrigues

Turnip mosaic virus: levantamento, identificação, caracterização biológica e molecular e aspectos epidemiológicos dos isolados brasileiros que infectam brássicas

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:

Professor Dr. Marcelo Eiras

Coorientador:

Professor Dr. John A. Walsh

São Paulo
2019

Eu, **Leilane Karam Rodrigues**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ___/___/___

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Rodrigues, Leilane Karam.

Turnip mosaic vírus: levantamento, identificação, caracterização biológica e molecular e aspectos epidemiológicos dos isolados brasileiros que infectam brássicas. / Leilane Karam Rodrigues. - São Paulo, 2019.

165 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2019T.LR002

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Marcelo Eiras.

Coorientador: John A. Walsh

Versão do título para o inglês: Turnip mosaic vírus: survey, identification, biological and molecular characterization and epidemiological features of the brazilian isolates infecting brassicas.

1. Afideos 2. Brassicaceae 3. Filogenia 4. *Potyvirus* 5. TuMV I.
Rodrigues, Leilane Karam II. Eiras, Marcelo III. Instituto Biológico (São Paulo)
IV. Título.

IB/Bibl./2019/002

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Leilane Karam Rodrigues

Título: Turnip mosaic virus: levantamento, identificação, caracterização biológica e molecular e aspectos epidemiológicos dos isolados brasileiros que infectam brássicas

Tese 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 Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Eiras Instituição: Instituto Biológico
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Dr^a. Kátia Regiane Brunelli Braga Instituição: Sakata Seed Sudamerica Ltda.
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr^a.Renata Faier Calegario Instituição: Universidade Federal do Paraná
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Dr^a. Juliana de Freitas Astúa Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva Instituição: Universidade do Estado de Santa Catarina
Julgamento:_____ Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marcelo Eiras, por mais esta oportunidade, pela orientação, ensinamentos, e confiança em mim depositada, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho, além da companhia e ajuda nas coletas de campo e pela contribuição na minha formação profissional e pessoal durante os oito anos que passei em seu laboratório.

Ao Professor Dr. John A. Walsh, pela coorientação, confiança, aprendizado, oportunidade e receptividade durante os seis meses que passei em seu laboratório na Universidade de Warwick, Reino Unido, que foram fundamentais para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Levi Rodrigues Chaves, pela amizade, constante apoio, ensinamentos, paciência, colaboração nas viagens e coletas de campo, pelos momentos de descontração e muitas risadas, além de todo apoio e dedicação nestes oito anos que convivemos no Instituto Biológico.

Às pesquisadoras do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico Dr^a. Maria Amélia Vaz Alexandre, Dr^a. Ligia Maria Lembo Duarte e Dra. Addolorata Colariccio, que sempre estiveram à disposição para tirar dúvidas, ajudar, ensinar e colaborar no que fosse preciso, além da amizade, apoio e, principalmente, pelos cafés deliciosos da Ligia, as guloseimas da Maria Amélia, e as conversas com a Dora.

À Dr^a. Kátia Regiane Brunelli (Sakata Seed Suldamérica Ltda.), pelo apoio, ensinamentos e colaboração, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese, incluindo a disponibilização de uma câmara de crescimento para a realização dos experimentos de patotipagem, e indicação de áreas de cultivo de brássicas para coleta das amostras.

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

Ao Professor Dr. Elliot W. Kitajima (ESALQ, USP), pela colaboração, envio de amostras de brássicas, além do preparo, análises e disponibilização das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende (ESALQ, USP), pelos ensinamentos e auxílio na purificação de um dos isolados virais.

À Professora Dr^a. Renata Faier Calegario (UFPR), pela colaboração no desenvolvimento desta tese, pelo envio das amostras, e por possibilitar as visitas nos campos de produção de brássicas no Paraná, além da receptividade, hospedagem e ótimos momentos de descontração durante nossas rápidas passagens por Curitiba.

Aos colegas de laboratório Alyne de Fatima Ramos, Agatha Mota de Oliveira, Lucas Araújo de Oliveira, Wallison Bezerra de Jesus, Priscila Megumi Yara, Luiz Gustavo Barros Alvim e Maria José Oliveira, que colaboraram de forma direta ou indireta neste trabalho, pela convivência, amizade, paciência, apoio, trocas de conhecimento, e pelos agradáveis momentos de descontração.

À Agatha Mota de Oliveira (quase mestra), por toda a paciência, amizade, ensinamentos, ajuda nos experimentos, pelos momentos de descontração, pelas viagens e por me perguntar inúmeras vezes a mesma coisa, fazendo com que eu aprimorasse minha paciência.

À equipe do Dr. John A. Walsh, Shannon, Lawrence, Angela e Diana, pela receptividade, paciência e ajuda nos experimentos e análises laboratoriais durante o período que passei na Universidade de Warwick, além dos almoços, jantares e momentos de descontração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, pelos ensinamentos e apoio durante a realização das disciplinas.

Aos membros da banca de defesa da tese de doutorado, Dr^a. Kátia Regiane Brunelli Braga, Dr^a. Renata Faier Calegario, Dr^a. Juliana de Freitas Astúa, Dr. Fabio Nascimento da Silva, Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, Dr. Ricardo Harakava e Dr^a Ligia Maria Lembo Duarte, pelas correções e excelentes sugestões para melhoria da qualidade deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço em especial a bolsa de doutorado CAPES e a do programa PDS, que possibilitou a minha ida para o exterior.

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 permitiram a realização deste trabalho e viabilizaram a colaboração internacional entre o Instituto Biológico e a Universidade de Warwick.

Ao meus pais, Marcia Rita Karam Rodrigues e Paulo Roberto Rodrigues, que sempre me apoiaram, incentivaram e deram todo o suporte necessário para que eu pudesse completar mais esta etapa.

E, finalmente, aos meus amigos e, em especial, ao meu namorado Rafael Gil Negreiros Rennó, por todo apoio, incentivo, paciência, compreensão e pelos inúmeros momentos de descontração e risadas.

“Se a nossa escolha é contemplar o pôr-do-sol, não fiquem preocupados em corrigir a nossa sombra. O sol a desenhará naquilo que escolhermos.”

(João Possidônio Jr.)

RODRIGUES, Leilane Karam. **Turnip mosaic virus: levantamento, identificação, caracterização biológica e molecular, e aspectos epidemiológicos dos isolados brasileiros que infectam brássicas**. 2019. 165 f. São Paulo-SP. Tese (Doutorado 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 turnip mosaic virus (TuMV) infecta espécies de diferentes famílias botânicas, sendo o único potyvírus capaz de infectar brássicas. Pode ser transmitido mecanicamente e de modo não persistente por mais de 80 espécies de afídeos. O TuMV é classificado em 12 patotipos, de acordo com reações em linhagens de *Brassica napus* que contêm (ou não) diferentes genes de resistência ao TuMV. Apesar de ser considerado o vírus mais importante que infecta brássicas no mundo, ainda há pouca informação sobre esse vírus na América do Sul. Com o objetivo de avançar no conhecimento da ocorrência, variabilidade genética e de aspectos biológicos e epidemiológicos do TuMV no Brasil, foram identificados e caracterizados 44 isolados de diferentes regiões produtoras de olerícolas. Cinco isolados tiveram seus genomas completamente sequenciados e, de acordo com análises filogenéticas da porção genômica correspondente à capa proteica, agruparam-se nos clados “World-B”, “Basal-B” e “BR”. Neste último, houve a formação de um clado denominado *Brazilian group*, que abrigou 31 isolados brasileiros de TuMV. Por meio de inoculações mecânicas em plantas pertencentes a 38 espécies e 12 famílias botânicas, observaram-se diferenças na expressão de sintomas entre os isolados. Porém, inoculações em linhagens diferenciais de *B. napus* revelaram que os 13 isolados brasileiros de TuMV avaliados neste trabalho pertenciam ao patotipo 1. Nos ensaios de transmissão por afídeos, observou-se que as espécies *Aphis fabae* e *Myzus persicae* (polífagos) foram mais eficientes na transmissão do TuMV, quando comparadas com *Brevicoryne brassicae* (monófago). Comprovou-se que os isolados brasileiros de TuMV apresentaram alta variabilidade, que aliada à sua capacidade de infectar brássicas da vegetação espontânea, serem transmitidos eficientemente por afídeos polífagos e de contornar genes de resistência, evidenciam seu potencial genético e epidemiológico em causar danos em espécies de brássicas cultivadas no Brasil.

Palavras-chave: Afídeos. Brassicaceae. Filogenia. Patotipo. *Potyvirus*. TuMV.

RODRIGUES, Leilane Karam. **Turnip mosaic virus: survey, identification, biological and molecular characterization and epidemiological features of the Brazilian isolates infecting brassicas**. 2019. 165 f. São Paulo-SP. Thesis (Doutorado 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

Turnip mosaic virus (TuMV) infects species of different botanic families and is the only potyvirus able of infecting brassicas. It can be mechanically and in a non-persistent manner transmitted by more than 80 species of aphids. TuMV is classified into 12 pathotypes, according to the reactions in lines of *Brassica napus*, which contain (or not) TuMV resistance genes. Despite being considered the most important virus that infect brassicas worldwide, there is little information about this virus in South America. Aiming to advance in the knowledge of occurrence, genetic diversity and biological and epidemiological aspects of this virus in Brazil, 44 isolates of TuMV were identified and characterized from different vegetable growing areas. Five isolates had their genomes completely sequenced and, according to phylogenetic analyses of the genomic portion corresponding to the coat protein, clustered into the clades World-B, Basal-B and BR. In the latter, a clade named *Brazilian group* was formed including 31 Brazilian TuMV isolates. The challenge, by mechanical inoculation, of 38 species from 12 botanical families, showed differences in the symptom's expression among the isolates. However, inoculations in differential lines of *B. napus* revealed the predominance of the pathotype 1 for 13 Brazilian TuMV isolates. In the transmission tests by aphids, *Aphis fabae* and *Myzus persicae* (polyphagous) were more efficient in the transmission of TuMV in comparison to *Brevicoryne brassicae* (monophagous). It was verified that the Brazilian TuMV isolates showed high variability, which, together with their ability to infect wild brassicas, to be transmitted efficiently by polyphagous aphids and to circumvent resistance genes, highlight its genetic and epidemiologic potential in causing damages in cultivated species of brassicas in Brazil.

Key words: Aphid. Brassicaceae. Phylogeny. Pathotype. *Potyvirus*. TuMV.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Classificação botânica, baseada em análises filogenéticas, com a indicação dos clados onde está inserida a ordem brassicales. [FONTE: adaptada de APG IV (2016)] 25
- Figura 2 - “Triangle of U”, que ilustra a relação genética entre as três espécies alotetraploides do gênero *Brassica* (*B. napus*, *B. carinata* e *B. juncea*) e seus ancestrais diploides (*B. oleracea*, *B. rapa* e *B. nigra*). Os cromossomos de cada genoma estão representados em cores diferentes. [(FONTE: adaptado de Nagaharu (1935)] 26
- Figura 3 - Alguns exemplos de seleção e melhoramento genético realizados a partir de *Brassica sylvestris* para obtenção das cultivares comerciais. [FONTE: adaptada de Vaughan e Geissler (2009)]. 27
- Figura 4 - Diferentes tipos de inflorescência e fruto da família brassicaceae. (A) inflorescência do tipo panícula; (B) inflorescência do tipo corimbo; (C) fruto do tipo síliqua; e (D) flor típica em formato de cruz (FONTE: O autor) 29
- Figura 5 - Distribuição geográfica da produção de olerícolas no Estado de São Paulo por mil hectares. [FONTE: adaptada de Camargo, Camargo e Camargo Filho (2008)]. 36
- Figura 6 - Produção (em toneladas, t) e área plantada (em hectares, ha) das principais brássicas cultivadas no Estado de São Paulo. Obs.: acelga neste caso se refere à espécie *Brassica rapa* spp. *pekinensis* (couve-chinesa). [FONTE: AGRIANUAL (2017)] 38
- Figura 7 - Volume comercializado (toneladas) das principais brássicas durante os anos de 2013, 2015 e 2017 somente nas centrais de abastecimento do Estado de São Paulo. [FONTE: AGRIANUAL (2017)] 38
- Figura 8 - (A) Representação esquemática da morfologia alongada e flexuosa da partícula dos membros da família *Potyviridae* (FONTE: O autor); (B) micrografia eletrônica de transmissão de uma preparação em contrastação negativa (*leaf-dip*) de extrato foliar de mostarda (*Brassica rapa*) infectada pelo TuMV, evidenciando a presença de uma partícula alongada e flexuosa com cerca de 750 nm de comprimento (FONTE: Dr. Elliot W. Kitajima); (C) representação esquemática do genoma de um potyvírus, com a indicação nas caixas coloridas das onze proteínas virais, além do terminal 5’ não traduzido (5’ UTR) ligado covalentemente à proteína VPG e o terminal 3’ não traduzido (3’ UTR) poliadenilado. (FONTE: O autor) 41
- Figura 9 - Sintomas induzidos pelo turnip mosaic virus (TuMV) em brássicas cultivadas e da vegetação espontânea: (A) clareamento de nervuras e leve deformação foliar em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*); (B) manchas e anéis cloróticos em brócolis (*B. oleracea* var. *italica*); (C) pontos necróticos e mosaico em couve-chinesa (*B. rapa* spp. *pekinensis*); (D) mosaico em brócolis; (E) amarelecimento acompanhando as nervuras (*vein banding*) em nabiça (*Raphanus raphanistrum*); (F) mosaico das nervuras (*vein banding*) em nabiça. (FONTE: O autor) 42
- Figura 10 - Campos de produção de couve-chinesa (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*) com elevada incidência de plantas infectadas pelo turnip mosaic virus (TuMV), com danos estimadas de produção de 60%. (A) campo de produção localizado no município de São José do Rio Pardo, SP, com destaque, em primeiro plano, para uma planta de couve-chinesa infectada por um isolado de TuMV com sintomas severos de pontos necróticos, mosaico e redução do crescimento (FONTE: O autor); e (B) campo de produção situado no município de

Biritiba Mirim, SP, com detalhe de uma planta de couve-chinesa subdesenvolvida infectada por um isolado de TuMV. (FONTE: Dr. Marcelo Eiras).....	42
Figura 11 - Morfologia externa, interna e divisão do corpo dos afídeos. (FONTE: O autor)	47
Figura 12 - Ciclo completo de reprodução de afídeos em regiões de clima temperado. (FONTE: O autor)	48
Figura 13 - Modos de transmissão de vírus de plantas por afídeos vetores: circulativo (propagativo e não propagativo) e não circulativo (semipersistente e não persistente). No centro, está representado um afídeo em corte longitudinal, com a indicação dos locais de interação (receptores de membrana, RM) das partículas virais em cada modo de transmissão. Na transmissão semipersistente, à esquerda, está representada a interação entre o cauliflower mosaic virus (CaMV) e o cibário, porção do aparelho bucal do afídeo. As proteínas virais, P2 e P3, fazem uma ponte entre a partícula viral e RM do cibário do afídeo. Na transmissão não persistente, à direita, estão representadas as interações de dois vírus de brássicas, o cole latent virus (CoLV) e o turnip mosaic virus (TuMV). Acredita-se que as partículas do CoLV se ligam diretamente a um RM localizado na ponta do estilete do afídeo (não se conhecem os detalhes dessa interação). No caso do TuMV, a ligação entre os RM localizados na ponta do estilete do inseto e a partícula viral depende da interação entre a capa proteica (CP) e a proteína do componente auxiliar (<i>helper component</i> , HC). A transmissão persistente (circulativa) está representada no centro, exemplificada pelo turnip yellows virus (TuYV). Nesse modo de transmissão, o vírus circula no corpo do inseto, passando, inicialmente, do intestino posterior para a hemocele, atingindo as glândulas salivares acessórias para ser então transmitido. O período de latência corresponde, nesse caso, ao tempo que o vírus leva desde a sua aquisição para circular no corpo do inseto até atingir as glândulas salivares acessórias e poder ser transmitido. Nos modos de transmissão semipersistente e não persistente, não há período de latência. Na transmissão de modo persistente, o período de acesso à aquisição (PAA) pode variar de horas a dias, uma vez que o afídeo necessita alongar os estiletes até as células do floema para adquirir o vírus. O período de acesso à inoculação (PAI) também varia de horas a dias. Na transmissão semi-persistente, o PAA é de minutos, enquanto o PAI varia de segundos a minutos. No modo de transmissão não-persistente tanto o PAA quanto o PAI varia de segundos a minutos. (FONTE: O autor).....	51
Figura 14 - Modo de transmissão persistente circulativo, não propagativo, típico do turnip yellows virus (TuYV). (A) passagem do vírus do seco intestinal para a hemocele do inseto vetor, onde vai ocorrer: (1) endocitose da partícula viral; (2) formação das vesículas contendo partícula do vírus; (3) fusão das vesículas ao endossoma; (4) rearranjo das partículas em vesículas tubulares; (5) fusão das vesículas tubulares na membrana basal; (6) liberação das partículas na hemocele. (B) passagem das partículas virais da hemocele para as glândulas salivares acessórias, onde ocorrerá: (7) endocitose das partículas virais; (8) formação dos endossomas tubulares; (9) divisão dos endossomas tubulares em vesículas simples; (10) fusão das vesículas no canal de microvasos; (11) liberação das partículas no interior das glândulas salivares. Intestino posterior (ip), glândula salivar (GS), ● = partícula viral. (FONTE: O autor).....	52
Figura 15 - Detalhe esquemático do corte longitudinal da ponta dos estiletes de um afídeo e os domínios (aminoácidos) funcionais necessários para que haja interação do turnip mosaic virus (TuMV) ao estilete do afídeo vetor (estratégia de transmissão que utiliza um	

componente auxiliar). O reconhecimento e ligação ocorre entre o receptor de membrana (RM) da cutícula estiletar do afídeo ao domínio KITC presente na proteína viral, não estrutural, HC (<i>helper component</i>). Outro domínio, PTK, também presente em HC, por sua vez, se liga ao domínio dag presente na porção N terminal da capa proteica do TuMV. HC funciona como uma “ponte” de ligação entre a partícula viral e o RM do estilete do afídeo. (FONTE: O autor)	55
Figura 16 - Representação esquemática simplificada da replicação dos vírus de RNA de fita simples de senso positivo no citoplasma de uma célula vegetal (veja o texto para maiores detalhes). (FONTE: O autor).....	56
Figura 17 - Principais funções das onze proteínas sintetizadas pelo turnip mosaic virus (TuMV). Estão indicadas em setas coloridas as proteases que clivam a poliproteína dando origem às proteínas virais: protease P1 (seta azul clara); protease HC-Pro (seta rosa) e protease NIa (seta azul escura). (FONTE: O autor)	57
Figura 18 - Esquema simplificado do processo de tradução das proteínas do turnip mosaic virus (TuMV) no citoplasma de uma célula vegetal. A circularização do RNA viral é intermediada por PABP (proteína de ligação à cauda de Poli-A) e outros fatores de iniciação da tradução em eucariontes como, por exemplo eIF(iso)4G e eIF(iso)4E, que promovem a aproximação dos terminais 3’ e 5’ não traduzidos do rna viral. No esquema, observa-se que a proteína VPg, ligada covalentemente ao terminal 5’ do RNA viral, se une ao eIF(iso)4E, que por sua vez se une a eIF(iso)4G, que se liga a PABP, unida à cauda poliadenilada do terminal 3’ do RNA viral. A tradução ocorre no citoplasma em associação às subunidades ribossomais 40S e 60S, sendo as proteínas sintetizadas em associação direta ao retículo endoplasmático rugoso (RE). (FONTE: O autor)	59
Figura 19 - Esquema da tradução das proteínas do turnip mosaic virus (TuMV) e formação das vesículas, que correspondem ao sítio de replicação do RNA viral. Após alguns ciclos de tradução, as proteínas 6K ₂ , VPg e NIa-Pro estarão em quantidades suficientes para o início da indução para a formação das vesículas. A proteína 6K ₂ acumula-se nos sítios de exportação do retículo endoplasmático rugoso (EREs), induzido a formação das vesículas replicativas. Nas vesículas ocorre o recrutamento dos fatores eucariontes envolvidos na tradução assim como na replicação do RNA viral e das proteínas virais sintetizadas. O acúmulo das proteínas em seu interior promove um aumento no tamanho da vesícula. (FONTE: O autor)	61
Figura 20 - Após a maturação, as vesículas migram para a periferia dos cloroplastos (pCL), local definido como o sítio de replicação do turnip mosaic virus (TuMV). A migração irá depender da associação das vesículas do tipo COPI e COPII derivadas do complexo de Golgi (G) que irá interagir com o citoesqueleto (miosina e actina) da célula vegetal carregando as vesículas do complexo replicativo (6K ₂) até pCL. (FONTE: O autor).....	62
Figura 21 - Movimento a curtas distâncias (célula a célula) típico dos potyvírus, no qual as proteínas virais P3N-PIPO e CI interagem com uma proteína de membrana do hospedeiro (PCaP1), aumentando o limite de exclusão dos pasmodemos (PD), possibilitando a passagem do complexo replicativo do vírus (6K ₂) para as células vizinhas. (G) – complexo de Golgi, (RE) retículo endoplasmático e (PC) parede celular. (FONTE: O autor)	65
Figura 22 - Esquema envolvendo os componentes associados a uma virose que se inter-relacionam em um agroecossistema. (FONTE: O autor)	70

- Figura 23 - Estados brasileiros e seus respectivos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras de espécies de brássicas. Em detalhe, o Estado de São Paulo e a indicação dos municípios (números de 1 a 17). (FONTE: O autor) 77
- Figura 24 - Locais onde foram realizados os experimentos de patotipagem dos treze (13) isolados de turnip mosaic virus (TuMV) selecionados neste trabalho. (A) câmaras com temperatura e luminosidade controladas da empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda., localizada no município de Bragança Paulista, SP; (B) estufas climatizadas da Universidade de Warwick, Reino Unido. (FONTE: O autor)..... 81
- Figura 25 - Teste de transmissão primária utilizando três espécies de afídeos. (A) teste de transmissibilidade das espécies de afídeos utilizando 5 afídeos por planta; (B) testes de eficiência e rota de transmissão de uma espécie de brássica cultivada (mostarda) para espécie cultivada (mostarda) e para uma espécie da vegetação espontânea (nabiça) e vice-versa. (PAA): período de acesso à aquisição; (PAI): período de acesso à inoculação. (FONTE: O autor) 85
- Figura 26 - Esquemas dos genomas dos vírus de brássicas identificados neste trabalho com os respectivos sítios de anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para as reações de RT-PCR e PCR. (A) turnip mosaic virus (TuMV), (B) cole latent virus (CoLV) e (C) cauliflower mosaic virus (CaMV). (FONTE: O autor) 90
- Figura 27 - Sintomas induzidos por isolados de turnip mosaic virus (TuMV) em linhagens diferenciadoras de *Brassica napus* utilizadas em experimentos de patotipagem. (A) sintoma de necrose sistêmica (+N) induzido na linhagem 22S pelo isolado T48; e (B) sintoma de mosaico sistêmico (+) induzido na linhagem S6 pelo isolado T06. (FONTE: O autor) 97
- Figura 28 - Sintomas induzidos por isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) em variedades de *Brassica* e *Raphanus*. (A) sintoma de mosaico e deformação foliar em couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) induzido pelo isolado T06; (B) e (C) mosaico e necrose sistêmica em couve-flor e brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), respectivamente, induzidos pelo isolado T31; (D) folha jovem de brócolis com necrose sistêmica induzida pelo isolado T48; (E) e (F) necrose sistêmica em mostarda-crespa (*B. rapa*) induzida pelo isolado T31; (G) mosaico em mostarda-lisa induzido pelo isolado T61; (H) pontos necróticos locais em mostarda-crespa induzido pelo isolado T48; (I) mosaico e deformação foliar em mostarda-japonesa induzido pelo isolado T22; (J) necrose sistêmica em folha de couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *pekinensis*); (K) sintomas induzidos pelos isolados T31 e T48 em couve-chinesa; (L) mosaico e má formação da cabeça em couve-chinesa inoculada mecanicamente com o isolado T48; (M) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T22 em rúcula (*Eruca sativa*); (N) e (O) sintomas de mosaico, distorção foliar e mau desenvolvimento das plantas de rúcula induzidos pelo isolado T06; (P) mosaico sistêmico induzido pelo isolado T61 em rabanete (*Raphanus sativus*); (Q) anéis cloróticos sistêmicos induzidos pelo isolado T48 em espinafre Nova Zelândia (*Tetragonia tetragonoides*); (R) e (S) sintomas de mosaico induzidos pelos isolados T31 e T06 em nabiça (*Raphanus raphanistrum*). (FONTE: O autor) 101
- Figura 29 - Sintomas induzidos por isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) em diferentes espécies de plantas indicadoras. (A) mosaico sistêmico e deformação foliar induzido pelo isolado T06 em *Nicotiana benthamiana*; (B) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T06 em *N. glutinosa*; (C) necrose sistêmica induzida pelo isolado T31 em *N. glutinosa*; (D) pontos cloróticos locais induzidos pelo isolado T48 em *N.*

- glutinosa*; (E) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T48 em *N. tabacum* Samsun NN; (F) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T22 em *N. tabacum* White burley; (G) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T31 em *N. sylvestris*; (H) ponto necrótico local induzido pelo isolado T48 em *N. tabacum* Xanthi; (I) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T31 em *Chenopodium amaranticolor*; e ponto necrótico induzidos pelo isolado T48 em *Gomphrena globosa*. (FONTE: O autor)..... 104
- Figura 30 - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) utilizando um único afídeo por planta, em testes de transmissão empregando *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae*. (Mo/Mo): transmissão de mostarda para mostarda; (Mo/Na) de mostarda para nabiça; (Na/Mo) de nabiça para mostarda; e (Na/Na) de nabiça para nabiça. As análises estatísticas foram realizadas utilizando blocos inteiramente casualizados, com teste de *Tukey* a 0,1%. Letras iguais indicam que não há diferença entre tratamentos e letras diferentes indicam que há diferença estatística entre tratamentos. (CV) coeficiente de variação. 106
- Figura 31 - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) de mostarda para mostarda (Mo/Mo), em testes experimentais, empregando *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae*, em tratamentos com um ou cinco afídeos por planta. As análises estatísticas foram realizadas utilizando blocos inteiramente casualizados, com teste de *Tukey* a 0,1%. Letras iguais indicam que não há diferença entre tratamentos e letras diferentes indicam que há diferença estatística entre tratamentos. (CV) coeficiente de variação. 107
- Figura 32 - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) em testes experimentais de transmissão empregando *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae*, utilizando um único indivíduo por planta, com aquisição do vírus em mostarda e nabiça para posterior transmissão para mostarda e nabiça. As análises estatísticas foram realizadas utilizando blocos inteiramente casualizados, com teste de *Tukey* a 0,1%. Letras iguais indicam que não há diferença entre tratamentos e letras diferentes indicam que há diferença estatística entre tratamentos. (CV) coeficiente de variação. 108
- Figura 33 - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) em testes experimentais de transmissão empregando *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae*, utilizando cinco indivíduos por planta, com aquisição do vírus em mostarda e posterior transmissão também para mostarda. As análises estatísticas foram realizadas utilizando blocos inteiramente casualizados, com teste de *Tukey* a 0,1%. Letras iguais indicam que não há diferença entre tratamentos e letras diferentes indicam que há diferença estatística entre tratamentos. (CV) coeficiente de variação. 108
- Figura 34 - Simulação da epidemiologia do turnip mosaic virus (TuMV) em um campo de cultivo de hortaliças, baseada nos resultados dos testes de transmissão experimental obtidos neste trabalho. As eficiências de transmissão das três espécies de afídeos estão indicadas nas linhas que fazem a ligação entre as plantas, sendo as linhas pretas para *aphis fabae*, verdes para *myzus persicae* e cinzas para o *Brevicoryne brassicae*: *Brassica* (cultivada)/*Brassica* (cultivada), *Brassica* (cultivada)/*Raphanus* (vegetação espontânea), *Raphanus* (vegetação espontânea)/*Brassica* (cultivada) e *Raphanus* (vegetação espontânea)/*Raphanus* (vegetação espontânea). (+) = afídeos que são capazes de colonizar brássicas; (-) = afídeos que não são capazes de colonizar brássicas. Linhas contínuas correspondem aos testes de transmissão empregando um único afídeo por planta e as

linhas tracejadas correspondem aos testes de transmissão empregando cinco afídeos por planta. O ponto de interrogação em vermelho representa a possível interação entre os cultivos de brássicas e de alface, uma vez que o TuMV pode infectar esta hospedeira. (FONTE: O autor)	109
Figura 35 - Matriz de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos para a região genômica correspondente à capa proteica (CP) completa, entre os isolados de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho.	110
Figura 36 - Matriz de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos para a região genômica correspondente a inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) parcial, entre os isolados de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho.	111
Figura 37 - Análises filogenéticas de máxima verossimilhança das sequências das porções genômicas da capa proteica, CP, completa (A) e inclusão citoplasmática cilíndrica, CI, parcial (B) dos isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho. Os grupos descritos ao lado direito da figura a, assim como os isolados utilizados para filogenia com os seus respectivos códigos de acesso no <i>Genbank</i> (Tabela 9, pag 90) foram propostos por Oshima et al. (2002). Em destaque (vermelho) estão os isolados brasileiros de TuMV sequenciados no presente trabalho. Um grupamento formado quase que exclusivamente por isolados brasileiros de TuMV pode ser observado na árvore da CP (à esquerda): <i>Brazilian group</i> . Os valores de <i>bootstrap</i> (para 1000 replicações) estão indicados acima dos ramos, sendo que tons verdes indicam valores mais baixos e tons alaranjados correspondem a valores mais elevados.	112
Figura 38 - Micrografia eletrônica de transmissão da preparação semipurificada do isolado T06 de turnip mosaic virus (TuMV) proveniente de raiz-forte do município de Divinolândia, SP. Observam-se partículas alongadas e flexuosas com cerca de 750 nm. Barra = 200 nm. (FONTE: Dr. Elliot W. Kitajima)	114
Figura 39 - Análises de integridade do rna (RIN) total extraído diretamente de folhas de mostarda (<i>Brassica rapa</i>) das cinco amostras infectadas por isolados de turnip mosaic virus (TuMV) para realização do sequenciamento completo dos genomas virais.....	115
Figura 40 - Esquema do genoma do turnip mosaic virus (TuMV) com a indicação (setas) dos sítios de clivagem na poliproteína (processamento pós-traducional), para os cinco isolados sequenciados neste trabalho, que originam as proteínas virais, com os seus respectivos aminoácidos: metionina (M); fenilalanina (F); tirosina (Y); serina (S); glicina (G); glutamina (Q); treonina (T); asparagina (N); alanina (A); ácido glutâmico (E); triptofano (W); leucina (L) e lisina (K).....	119
Figura 41 - Árvore filogenética obtida por meio de análise de máxima verossimilhança a partir do alinhamento múltiplo das sequências completas do genoma dos isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV): T06, T22, T31, T48 e T61. Os grupos descritos ao lado direito, assim como os isolados utilizados para filogenia com os seus respectivos códigos de acesso no <i>Genbank</i> (Tabela 9, pag 90) foram propostos por Oshima et al. (2002). Observa-se a formação de um clado (<i>Brazilian group</i>) envolvendo três isolados brasileiros no grupo filogenético br. Os valores de <i>bootstrap</i> (para 1000 replicações) estão indicados acima dos ramos, sendo que os tons mais verdes indicam valores mais baixos e tons alaranjados correspondem a valores mais elevados de <i>bootstrap</i>	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de trabalhos publicados no Brasil, que descrevem a identificação e ocorrência do turnip mosaic virus (TuMV) em diferentes hospedeiras	40
Tabela 2 - Genes dominantes e recessivos associados à resistência de plantas a potyvírus.....	73
Tabela 3 - Localização geográfica e número de amostras coletadas em cada município ou Estado amostrado	78
Tabela 4 - Espécies de plantas cultivadas submetidas à inoculação mecânica com os cinco diferentes isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) selecionados para a determinação da gama de hospedeiros	79
Tabela 5 - Espécies de plantas indicadoras e da vegetação espontânea submetidas a inoculação mecânica com cinco diferentes isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) selecionados para a determinação da gama de hospedeiros	80
Tabela 6 - isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) selecionados para a patotipagem	81
Tabela 7 - Diferenciação dos isolados de turnip mosaic virus (TuMV) em patotipos de acordo com as reações de linhagens de brassica napus segundo Jenner e Walsh (1996) e Hughes et al. (2003)	82
Tabela 8 - Oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados nas reações de RT-PCR para o turnip mosaic virus (TuMV) e o cole latent virus (CoLV), e PCR para o cauliflower mosaic virus (CaMV)	89
Tabela 9 - Isolados de turnip mosaic virus (TuMV), com sequências completas do genoma depositadas no <i>Genbank</i> , utilizados nas análises filogenéticas.....	92
Tabela 10 -Levantamento e identificação molecular de isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV), cole latent virus (CoLV) e cauliflower mosaic virus (CaMV): código das amostras, hospedeiras, locais de coleta e os resultados obtidos por PCR.....	95
Tabela 11 - Resultado da patotipagem dos treze isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) quando inoculados mecanicamente em linhagens diferenciadoras de <i>Brassica napus</i>	98
Tabela 12 - Gama experimental de hospedeiros (espécies cultivadas de importância comercial) de cinco isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) caracterizados neste trabalho por meio de inoculações mecânicas	102
Tabela 13 - Gama experimental de hospedeiros da vegetação espontânea e espécies indicadoras dos cinco isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) caracterizados neste trabalho por meio de inoculações mecânicas	103
Tabela 14 - Parâmetros mensurados para as análises da integridade do rna a partir dos RNA totais extraídos de folhas de mostarda (<i>Brassica rapa</i>) infectadas	116
Tabela 15 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da ORF da poliproteína dos genomas completos dos cinco isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho.....	117
Tabela 16 - Comparação da porcentagem de identidade de nucleotídeos por região genômica, correspondente a cada proteína, entre os cinco isolados de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho	118
Tabela 17 - Diferenciação de aminoácidos relacionados na proteína P3 dos isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV).....	119

Tabela 18 -Eventos de recombinação que ocorreram para os cinco isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho	122
Tabela 19 - códigos de acesso no <i>Genbank</i> das sequências dos isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho correspondentes à capa proteica, CP, completa, inclusão citoplásmica cilíndrica, CI, parcial e do genoma completo de cinco isolados de TuMV	124

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV) utilizando um único afídeo da espécie espécie <i>Myzus persicae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%.....	161
Anexo B - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV) utilizando um único afídeo da espécie <i>Aphis fabae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%	161
Anexo C - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV) utilizando um único afídeo da espécie <i>Brevicoryne brassicae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%.....	161
Anexo D - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV) utilizando um e cinco afídeos da espécie <i>Myzus persicae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%	162
Anexo E - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV) utilizando um e cinco afídeos da espécie <i>Aphis fabae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%	162
Anexo F - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV) utilizando um e cinco afídeos da espécie <i>Brevicoryne brassicae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%.....	162
Anexo G - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV), de mostarda para mostarda (Mo/Mo), utilizando um único afídeo das espécies <i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis fabae</i> e <i>Brevicoryne brassicae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%	163
Anexo H - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV), de mostarda para nabiça (Mo/Na), utilizando um único afídeo das espécies <i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis fabae</i> e <i>Brevicoryne brassicae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%	163
Anexo I - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV), de nabiça para mostrada (Na/Mo), utilizando um único afídeo das espécies <i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis fabae</i> e <i>Brevicoryne brassicae</i> por planta. Teste de <i>Tukey</i> a 0,1%	163
Anexo J - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV), de nabiça para nabiça (Na/Na), utilizando um único afídeo das espécies <i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis fabae</i> e <i>Brevicoryne brassicae</i> por planta. Teste de <i>tukey</i> a 0,1%	164
Anexo K - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic vírus (TuMV), de mostarda para mostrada (Mo/Mo), utilizando cinco afídeos das espécies <i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis fabae</i> e <i>Brevicoryne brassicae</i> por planta. Teste de <i>tukey</i> a 0,1%.....	164
Anexo L - Eventos de recombinação que ocorreram entre os 44 isolados de turnip mosaic virus (TuMV) paras as regiões genômicas correspondentes a capa proteica (CP) completa e inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) parcia	165

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Olericultura e as brássicas.....	23
2.1.1	Breve histórico.....	23
2.1.2	Brássicas: características gerais, classificação e origem.....	24
2.1.3	Sistema de produção de olerícolas.....	29
2.1.4	Importância das brássicas na alimentação.....	30
2.1.5	Perfil do consumidor e forma de consumo.....	31
2.1.6	Importância econômica e social.....	33
2.2	Turnip mosaic virus (TuMV): histórico, ocorrência, classificação e características biológicas e moleculares.....	38
2.3	Transmissão e disseminação do TuMV.....	44
2.3.1	Afídeos e sua importância na transmissão do TuMV.....	46
2.3.2	Modos de transmissão.....	49
2.4	Replicação do tumv na célula vegetal.....	56
2.5	Aspectos relacionados ao controle e imunidade inata em plantas.....	67
2.5.1	Resistência genética e os genes que conferem resistência ao TuMV.....	71
3	OBJETIVOS.....	75
3.1	Objetivo geral.....	75
3.2	Objetivos específicos.....	75
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	76
4.1	Coleta do material vegetal.....	76
4.2	Identificação e caracterização dos isolados de TuMV.....	78
4.2.1	Inoculação mecânica e gama de hospedeiros.....	78
4.2.2	Patotipagem dos isolados virais.....	79
4.2.3	<i>Double Antibody Sandwich</i> – ELISA (DAS-ELISA).....	82
4.2.4	<i>Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosobent Assay</i> (PTA-ELISA).....	83
4.3	Testes de transmissão por afídeos.....	84
4.4	Extração de RNA total de material vegetal.....	86
4.5	Extração de DNA.....	87
4.6	Semipurificação dos isolados virais.....	87
4.7	Amplificação por PCR (<i>Polymerase Chain Reacion</i>).....	88
4.8	Sequenciamento de DNA.....	89
4.9	Sequenciamento de nova geração (NGS).....	89

4.10	Análise das sequências de DNA e filogenia.....	91
4.11	Preservação dos isolados virais.....	92
4.12	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	93
5	RESULTADOS.....	94
5.1	Levantamento e caracterização dos isolados virais.....	94
5.2	Análises biológicas: gama de hospedeiro e patotipagem.....	97
5.3	Transmissão por afídeos.....	104
5.4	Diversidade genética dos isolados brasileiros de TuMV: sequenciamento e análise das sequências.....	110
6	DISCUSSÃO.....	125
6.1	Levantamento, testes biológicos e patotipagem.....	125
6.2	Transmissão por afídeos.....	131
6.3	Diversidade genética dos isolados brasileiros de TuMV.....	134
7	CONCLUSÕES.....	138
8	REFERÊNCIAS.....	140

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil figura entre os dez maiores produtores mundiais de olerícolas, com produção em constante expansão (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS, 2017). O Estado de São Paulo se destaca como líder nacional na produção de hortaliças com os cultivos concentrados no entorno da cidade de São Paulo no chamado cinturão verde (MADEIRA et al., 2008).

Olerícolas da família Brassicaceae, pertencentes aos gêneros *Brassica* e *Raphanus*, abrangem o maior número de espécies e variedades cultivadas e têm papel de destaque na agricultura do Centro-Sul do Brasil (FILGUEIRA, 2008). Apesar da importância econômica das brássicas, sua produção é limitada pela ocorrência de doenças, com destaque para as de etiologia viral. No mundo, já foram descritas nove espécies de vírus em brássicas e, no Brasil, até o presente momento, foram descritas três espécies: *Turnip mosaic virus* (*Potyvirus*) (SHATTUCK, 1992); *Cauliflower mosaic virus* (*Caulimovirus*) (CUPERTINO, KITAJIMA & COSTA 1986) e *Cole latent virus* (*Carlavirus*) (KITAJIMA et al. 1970), além do relato da ocorrência de um vírus, identificado na época como um isolado do beet western yellows virus (BWYV), atualmente classificado como turnip yellows virus (TuYV, *Polerovirus*) (COSTA, 1980).

A primeira evidência de infecção de uma espécie de brássica pelo turnip mosaic virus (TuMV) foi na França (1862), em *Matthiola incana* (Goivo – Brassicaceae), causando quebra de coloração das pétalas (TOMPKINS, 1939). O TuMV tem ocorrência mundial, sendo relatado em regiões de clima temperado, subtropical e tropical (KITAJIMA, 2015). No Brasil, o TuMV foi relatado pela vez primeira vez em plantações comerciais de couve no Estado de São Paulo (COSTA et al., 1972). Atualmente, além do Estado de São Paulo, o TuMV também foi relatado em cultivos de brássicas nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná e Distrito Federal (KITAJIMA, 2015). Diferentemente da maioria dos potyvírus, que apresenta gama de hospedeiros restrita, o TuMV infecta centenas de espécies de plantas de diferentes famílias. Suas partículas apresentam morfologia alongada flexuosa, com genoma constituído de RNA de fita simples senso positivo (+ssRNA), com duas fases abertas de leitura (*Open Reading Frame*, ORF). O TuMV é o único potyvírus que infecta brássicas (ADAMS et al., 2012).

Em função da sua variabilidade genética, que reflete no comportamento biológico dos isolados virais como, por exemplo, na gama de hospedeiros e expressão de sintomas, o TuMV tem sido classificado em estirpes e/ou patotipos. De acordo com a

capacidade de induzir (ou não) sintomas em linhagens de *Brassica napus* (Rape S6, Rape R4, Swede 165 e Swede S1), os isolados de TuMV são classificados em 12 patotipos (JENNER & WALSH, 1996).

O TuMV é transmitido de maneira não persistente por diversas espécies de afídeos, incluindo *Brevicoryne brassicae* L., que coloniza várias espécies de brássicas (WALSH et al., 2002). Pode infectar todas as espécies de brássicas comerciais e da vegetação espontânea, sendo que os sintomas podem variar de acordo com as interações vírus-hospedeiro, das estirpes do vírus e dos fatores ambientais (SHATTUCK, 1992). Em brássicas, os sintomas mais comuns são observados nas folhas como: mosaico, bolhas, clareamento de nervuras e anéis cloróticos ou necróticos. Em alguns casos, pode causar deformações severas, comprometendo a formação da cabeça nas variedades *capitata* ou transcorrer de forma assintomática, facilitando a dispersão do vírus pelo intercâmbio de plantas e mudas supostamente sadias (COLARICCIO et al., 2000).

Os principais métodos preconizados para o controle do TuMV estão relacionados com o manejo cultural como: (i) remoção de plantas infectadas e de potenciais reservatórios do vírus e/ou dos afídeos vetores; (ii) mudança das épocas de plantio, evitando os picos de revoadas dos afídeos; (iii) utilização de variedades tolerantes e/ou resistentes (SHATTUCK, 1992).

Como o método mais eficiente de controle de vírus de plantas é o emprego de variedades resistentes, muitos estudos têm sido direcionados para a identificação e mapeamento de genes de resistência ao TuMV em espécies de brássicas. Nos últimos anos, alguns genes de resistência foram identificados e mapeados em variedades de *Brassica rapa* e *B. napus*. Entre eles estão diferentes genes denominados *TuMV resistance in brassica* (*TuRB01*, *TuRB01b*, *TuRB03*, *TuRB04* e *TuRB05*), que conferem resistência específica a alguns patotipos do TuMV. Outros denominados *retr01* (recessivo) e *conTR01* (dominante) conferem juntos amplo espectro de resistência aos patotipos 1, 3, 4, 7, 8, 9 e 12 (WALSH & JENNER, 2002).

O TuMV é um dos vírus mais estudados por causar importantes danos e consequentes perdas em culturas de importância econômica. Porém, ainda pouco se conhece sobre a variabilidade genética desse vírus em países da América do Sul, principalmente no Brasil, onde relatos esporádicos de sua ocorrência foram reportados em variedades de brássicas (COSTA et al., 1972; DE ÁVILA et al., 1980; BARBOSA et al., 2000; COLARICCIO et al., 2000). Vale ressaltar também que, até o momento, não havia um levantamento sistemático de identificação e caracterização de isolados de TuMV no Brasil, e tampouco estudos moleculares

e epidemiológicos desse vírus em regiões de clima tropical, o que dificulta as tomadas de decisão e estratégias de manejo e controle.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo principal a realização de um levantamento sistemático de amostras de TuMV em campos de produção de brássicas para a identificação e caracterização biológica e molecular de isolados de TuMV, e mapear a variabilidade genética e biológica desse vírus. Simultaneamente, estudos de transmissão e patotipagem dos isolados virais, realizados neste trabalho, permitirão compreender os aspectos epidemiológicos para que se possa avançar nas estratégias de manejo e controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OLERICUTURA E AS BRÁSSICAS

2.1.1 BREVE HISTÓRICO

No Brasil, a olericultura teve início com a colonização portuguesa, por volta de 1530 (MADEIRA et al., 2008). Os hábitos alimentares dos brasileiros, assim como os aspectos culturais, que se caracterizam pelo consumo de inúmeras variedades de espécies exóticas e nativas, foram fortemente influenciados pela miscigenação entre portugueses (posteriormente por outros europeus), índios e africanos (COELHO, 2007). Entre as plantas introduzidas naquela época, devido às trocas de produtos de origem vegetal entre Brasil, Europa, África e Ásia, estavam: cana-de-açúcar, algumas frutíferas (limão, laranja e romã) e as brássicas (couve, repolho, nabo e mostarda). Os jesuítas, que aqui chegaram por volta de 1549, também tiveram influência no consumo de olerícolas, contribuindo para a sua disseminação durante os 200 anos de permanência no território brasileiro (MADEIRA et al., 2008, MELO & MELO, 2016).

A olericultura brasileira teve um grande impacto com a chegada da família real, em 1808, com uma comitiva composta por mais de 80.000 pessoas. A partir desse momento, houve uma intensificação na produção de olerícolas no Brasil, uma vez que os portugueses começaram a produzir seus alimentos em maior escala, além de introduzirem novas cultivares (MADEIRA et al., 2008). No entanto, somente com a chegada dos imigrantes japoneses, as olerícolas passaram a ter importância econômica (NASS et al., 2001). Eles vieram para substituir a mão de obra escrava nas lavouras de café e, posteriormente, arrendaram terras para o cultivo de olerícolas. Assim, surgiram, entre os anos de 1915 e 1940, os chamados cinturões

verdes, principalmente devido ao desenvolvimento rural ao redor das cidades, que se apresentavam como atividade alternativa, diversificada e comercialmente rentável (SATO et al., 2008).

No final da década de 1930, iniciaram-se as pesquisas formais em olericultura, com a instalação do primeiro centro de pesquisas no município de Domingos Petrolina no Estado do Rio Grande do Sul. Inicialmente, as pesquisas eram voltadas para a produção de cebola, tomate, alho, aspargo e batata (COUTO, 1997). Na década de 1940, a olericultura começou a evoluir. Os cinturões verdes instalaram-se no entorno das cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, regiões de grande importância econômica, e surgiram os primeiros mercados atacadistas (COELHO, 2007, MELO & MELO, 2016).

Nos anos 1980 houve avanços na modernização da olericultura brasileira com pesquisas que possibilitaram o lançamento de variedades mais adaptadas ao clima, além do desenvolvimento de diferentes técnicas de cultivo. Como exemplo, podem ser citadas: (i) a produção de mudas de morango livres de vírus; (ii) o surgimento dos primeiros híbridos de brássicas; (iii) o lançamento de variedades de cenoura resistentes a altas temperaturas; e (iv) a semeadura direta da alface, o que proporcionou a produção destas olerícolas em larga escala. Nessa época, iniciou-se também a venda de olerícolas em supermercados, varejões e sacolões (MINAMI, 1999; INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - INCAPER, 2017).

2.1.2 BRÁSSICAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS, CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM

De acordo com a classificação botânica baseada em caracteres morfológicos, a família Brassicaceae, anteriormente denominada Cruciferae devido ao formato de cruz de suas flores, pertence ao reino Plantae, classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae e ordem Brassicales (FILGUEIRA, 2008). Mais recentemente, porém, de acordo com a última classificação publicada pelo *Angiosperm Phylogeny Group* (APG IV, 2016), que se baseia em análises filogenéticas, as ordens passaram a ser agrupadas em clados de acordo com seu ancestral comum (Figura 1). Brassicaceae apresenta distribuição cosmopolita, composta por aproximadamente 4.000 espécies pertencentes a 400 gêneros. No Brasil, ocorrem naturalmente sete gêneros com cerca de 50 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005; PAULINO, 2008). Há controvérsia sobre o centro de origem das brássicas. Porém, acredita-se que sejam originárias

das zonas costeiras da Europa e Mediterrâneo, sendo posteriormente distribuídas por toda a Europa e, mais tarde, para outras partes do mundo, incluindo o Brasil (FILGUEIRA, 2008).

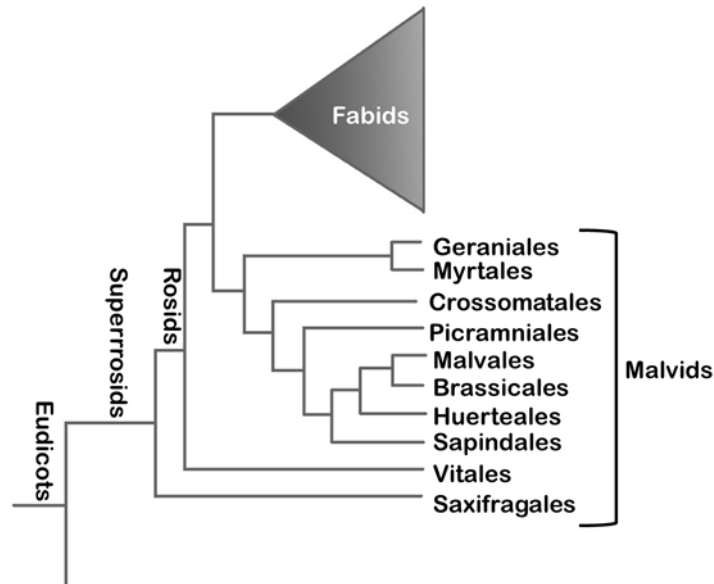


Figura 1- Classificação botânica, baseada em análises filogenéticas, com a indicação dos clados onde está inserida a ordem Brassicales. [FONTE: adaptada de APG IV (2016)]

Com o passar dos anos, o homem domesticou e modificou geneticamente espécies dessa família, originando as variedades comerciais. A evolução do gênero *Brassica* pode ser representada pelo “Triangle of U” (NAGAHARU, 1935), que apresenta como base três ancestrais comuns diploides: *Brassica rapa*, *B. nigra* e *B. oleracea*. As hibridizações dessas três espécies originaram outras três alotetraploides: *B. carinata*, *B. juncea* e *B. napus* (Figura 2) (CHENG, WU & WANG et al., 2014; RAKOW, 2004).

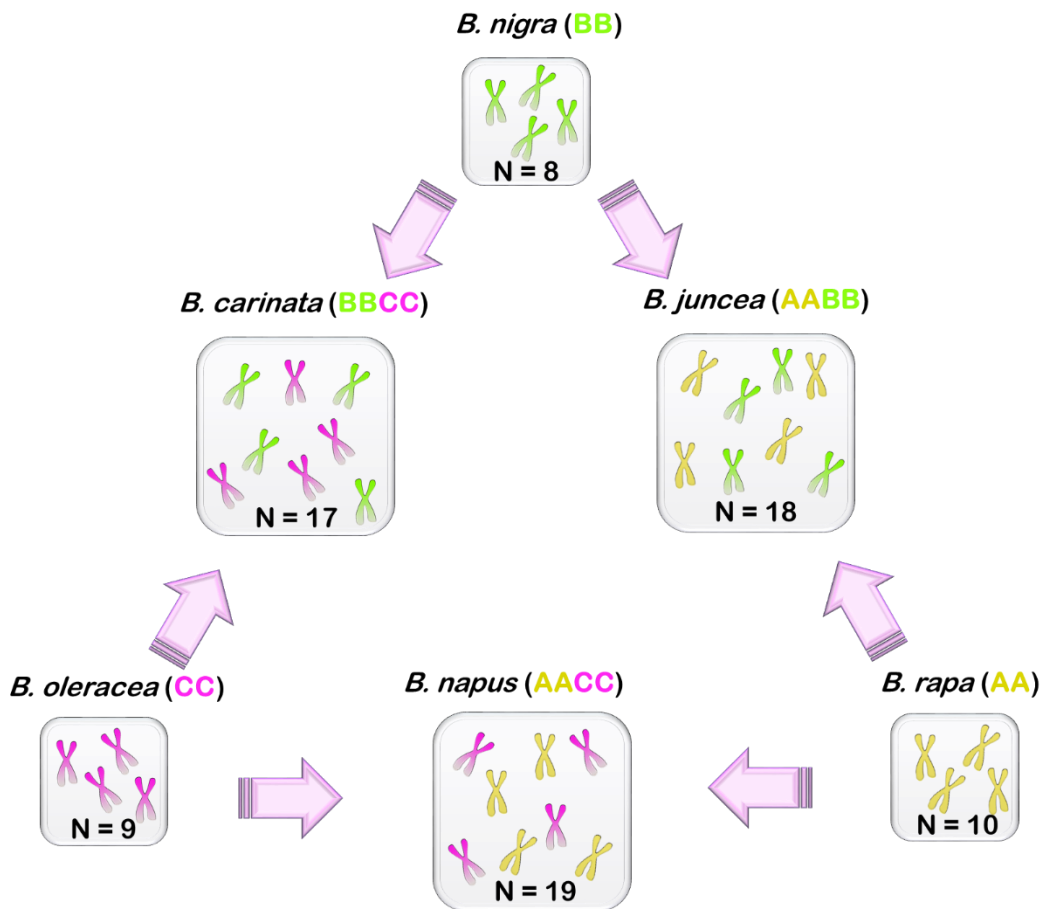


Figura 2 - “Triangle of U”, que ilustra a relação genética entre as três espécies alotetraploides do gênero *Brassica* (*B. napus*, *B. carinata* e *B. juncea*) e seus ancestrais diploides (*B. oleracea*, *B. rapa* e *B. nigra*). Os cromossomos de cada genoma estão representados em cores diferentes. [(FONTE: adaptado de Nagaharu (1935))]

As variedades de *B. oleracea* surgiram a partir de seleção e acúmulo de mutações durante o processo de domesticação de *B. sylvestris* encontrada na região do Mediterrâneo, principalmente na Itália, que se assemelha a uma couve-flor (Figura 3) (VAUGHAN & GEISSLER, 2009). Devido ao seu valor nutritivo, a área foliar foi a primeira a sofrer modificação no processo de domesticação. Uma mutação no gene *Fer leaf* promoveu um maior ganho de massa devido, principalmente, à sobreposição e aumento da densidade foliar, além de reduzir o tamanho dos talos, o que deu origem à couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Ao se promover o encurtamento dos talos, as folhas basais passaram a cobrir as folhas novas, levando à formação de “cabeça”, o que originou o repolho (*B. oleracea* var. *capitata*). O gene responsável por esta característica foi denominado de *Dwarf* (anão), e está diretamente relacionado à produção de giberelina (WILLS, 1977).

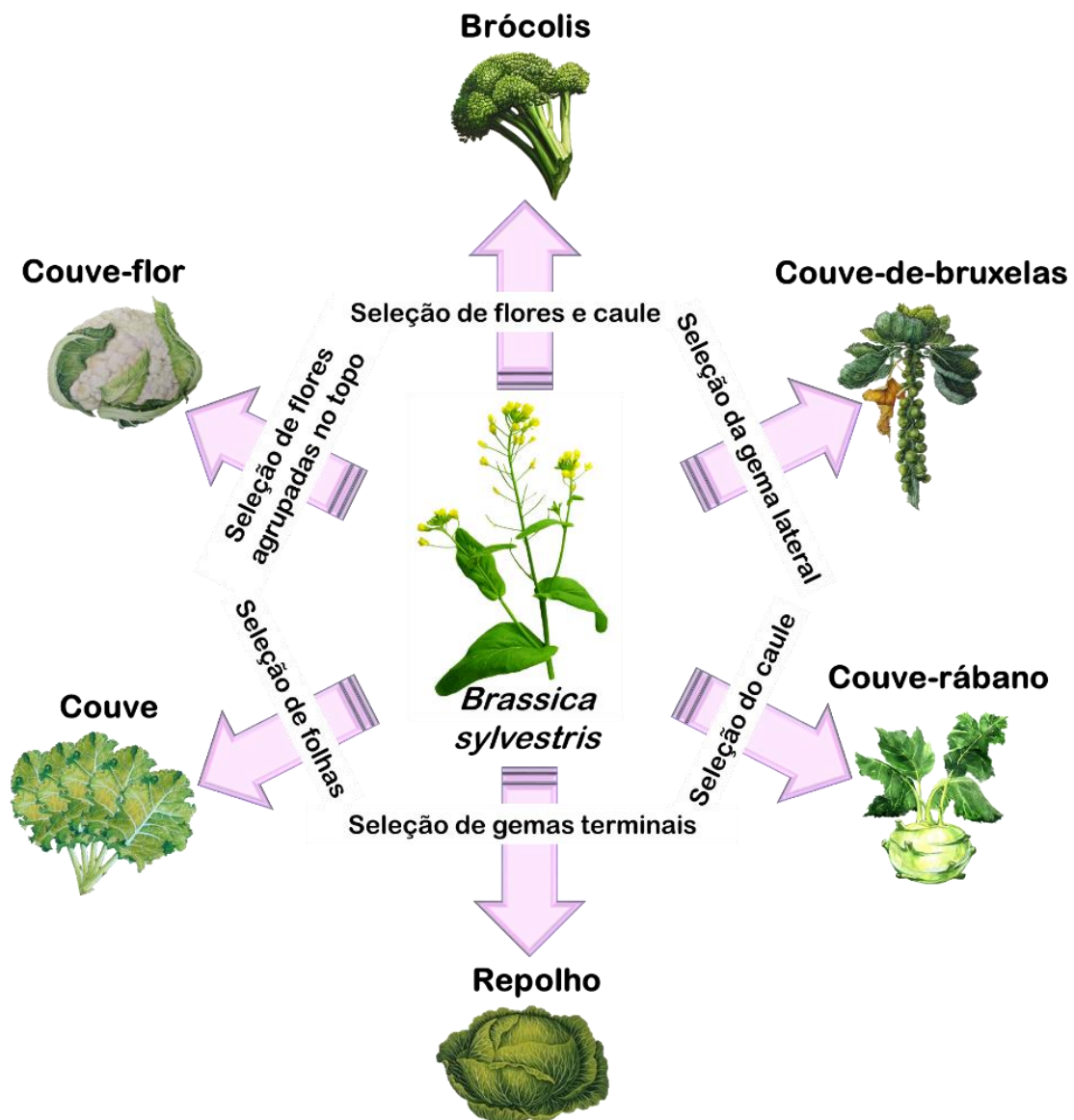


Figura 3 - Alguns exemplos de seleção e melhoramento genético realizados a partir de *Brassica sylvestris* para obtenção das cultivares comerciais. [FONTE: adaptada de Vaughan e Geissler (2009)]

Devido às modificações genéticas nas inflorescências, que se tornaram mais densas e maiores, surgiram os brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) e a couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*). Os brócolis surgiram a partir de modificações genéticas no gene *Apetala1* (*AP1*), que interfere na formação e desenvolvimento dos botões florais, impedindo sua transformação em flores maduras. Já no caso da couve-flor, selecionaram-se plantas que continham o gene *Cauliflower* (*CAL*) que promove o abortamento das flores (SMYTH, 1995). Mutações na família de genes conhecida como *Squamosa Promoter Binding* (*SPB*), promoveu a proliferação de gemas auxiliares com desenvolvimento de pequenas estruturas repletas de folhas, originando

a couve-de-bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*) (SONG, OSBORN & WILLIAMS, 1990). A partir de modificações no desenvolvimento da base do caule surgiu a couve-rábano (*B. oleracea* var. *gongyloides*), fazendo com que essa parte comestível ficasse semelhante a um tubérculo (HANCOCK, 1992).

Brassicaceae é considerada uma das famílias mais importantes, do ponto de vista econômico inserida na olericultura, com destaque para couve-manteiga (*B. oleracea* var. *acephala*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), além da raiz-forte (*Armoracia rusticana*), rabanete (*Raphanus sativus*) e canola (*B. napus*) (ALMEIDA, 2016). Algumas espécies são cultivadas como plantas ornamentais como o repolho ornamental (*B. oleracea* var. *acephala*) e o alisso (*Lobularia maritima*). Além disso, há diversas espécies de brássicas da vegetação espontânea, como as mostardas selvagens (*B. rapa*, *Rapistrum rugosum* e *Sinapis arvensis*), o agrião-bravo (*Cardamine bonariensis*), o mastruço (*Coronopus didymus*), o mentruz (*Lepidium* spp.) e a nabiça (*Raphanus raphanistrum*) (SOUZA & LORENZI, 2005).

Outra espécie importante pertencente à Brassicaceae, mas que não está diretamente relacionada à produção de alimentos, é *Arabidopsis thaliana*. Essa espécie possui ampla distribuição na Europa, Ásia e América do Norte (HOFFMANN, 2002). Além disso, apresenta uma ampla gama de ecótipos, tendo destaque ‘Columbia’ e ‘Landsberg’ (MEINKE et al., 1998). *Arabidopsis thaliana* foi a primeira espécie de planta a ter o genoma totalmente sequenciado. É utilizada para avaliação de agentes biológicos (patogênicos) e ambientais de estresse a compostos antropogênicos tóxicos nos diferentes níveis de organização biológica, além de ser modelo para estudo nas áreas de genética, fitopatologia, fisiologia e bioquímica (KRIZEK et al., 2003).

Brassicaceae, apesar de apresentar variabilidade morfológica, em sua maioria, é constituída de plantas herbáceas, de ciclos anuais, bianuais ou perenes. As folhas são simples ou compostas e alternadas. As raízes, muitas vezes, apresentam engrossamento ou tubérculos. As flores são hermafroditas, possuem quatro pétalas alternadas em formato de cruz e quatro sépalas livres, e são geralmente agrupadas em inflorescências como cachos e corimbo, e o fruto é do tipo síliqua (Figura 4) (CHENG, WU & WANG et al., 2014).

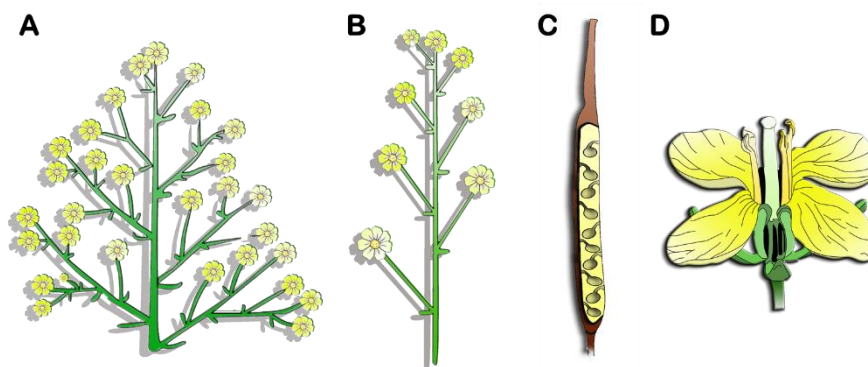


Figura 4 - Diferentes tipos de inflorescência e fruto da família Brassicaceae. (A) Inflorescência do tipo panícula; (B) Inflorescência do tipo corimbo; (C) Fruto do tipo síliqua; e (D) Flor típica em formato de cruz. (FONTE: O autor)

2.1.3 SISTEMA DE PRODUÇÃO DE OLERÍCOLAS

Os sistemas de produção de olerícolas são complexos e variáveis, abrangendo desde práticas agrícolas com tecnologias simples, normalmente observadas na agricultura familiar, ao emprego de elevados níveis tecnológicos utilizados geralmente por horticultores empresariais (BLANCO & BLAT, 2014). O cultivo a campo aberto é o sistema de produção de olerícolas mais utilizado no Brasil, uma vez que o país apresenta condições edafoclimáticas que permitem o cultivo durante todo o ano, conseguindo abastecer os mercados consumidores (FILGUEIRA, 2000). Esse sistema é característico da agricultura familiar, praticada nos cinturões verdes, com a produção destinada aos grandes mercados consumidores.

Porém, o cultivo protegido também é bem difundido na olericultura, no qual emprega-se tecnologia para o controle das condições edafoclimáticas favorecendo um bom desenvolvimento fisiológico e produtivo das culturas. No Brasil, esse sistema é utilizado principalmente para proteger as plantas contra pragas, doenças e, principalmente, das fortes chuvas tropicais, granizo e geadas na região sul do país (GRANDE et al., 2003). Com o objetivo de fugir da sazonalidade, obter produtos com melhor qualidade, aumentar o rendimento e consequentemente melhor remuneração para os agricultores, o cultivo protegido tem se expandido nos últimos anos no Brasil (FIGUEIREDO, 2011). No entanto, devido ao emprego de técnicas inadequadas e alto custo de produção, muitos produtores abandonam esse tipo de sistema (SILVA et al., 2014).

Vale destacar que, no Brasil, os cultivos em casas de vegetação tiveram início na década de 1960, passando a ser amplamente utilizados somente a partir da década de 1990 (GRANDE et al., 2003). Recentemente, o Brasil atingiu a marca de 25 mil ha produtivos de

cultivo protegido, sendo que o Estado de São Paulo se destaca como líder nacional (GUEDES, 2015).

2.1.4 IMPORTÂNCIA DAS BRÁSSICAS NA ALIMENTAÇÃO

Nos últimos anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado o consumo de frutas e olerícolas. A recomendação é que de 6 a 7% (400 g) do total de energia consumida diariamente seja oriunda desses alimentos. No entanto, de acordo com o Órgão de Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do IBGE, a quantidade de frutas e olerícolas consumidas pelos brasileiros varia entre 1 e 3,5% (132 g por dia) de acordo com a renda familiar. A pesquisa evidenciou que o consumo de olerícolas nas regiões Sul e Sudeste é em média 60% superior quando comparado com as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (MELO & VILELA, 2007).

Considerados alimentos regulatórios, muitas olerícolas são indispensáveis para o bom funcionamento do organismo. Seu consumo pode ajudar a prevenir doenças, além de fornecer vitaminas e minerais que auxiliam no desenvolvimento metabólico (COELHO, 2007). Possuem baixa porcentagem de gorduras e proteínas, são ricas em fibras e carboidratos e são fontes importantes de vitaminas A, B₆, C e E (KADER, 2001). Algumas doenças podem ser prevenidas com o consumo de olerícolas: obesidade, diabetes, câncer, hipertensão, osteoporose e problemas vasculares.

As brássicas, consideradas as olerícolas mais consumidas na alimentação humana, são fontes de compostos bioativos, especialmente organossulfurados, importantes antioxidantes. Os tocoferóis e ascorbatos, por exemplo, têm potencial para prevenir doenças degenerativas. Seu metabolismo secundário origina precursores do isotiocianato, um composto anticancerígeno (NUNES, 2009). Os bioflavonoides, presentes em muitas brássicas, auxiliam no combate aos radicais livres. As brássicas de coloração branca como a couve-flor contêm selênio, flavonoides e organossulfurados, que auxiliam no fortalecimento dos sistemas imunológico e circulatório, atuando contra doenças crônicas ligadas ao envelhecimento, alergias e processos inflamatórios. As de coloração verde como a couve, ajudam a prevenir deficiência de vitamina A, ajudam no crescimento, além de fornecer outras vitaminas essenciais (RODRIGUES, 2005). Couve-flor, couve, brócolis e couve-de-Bruxelas são ricas em vitamina C, que ajuda a combater bronquite, catarata, infertilidade masculina, além de aumentar a resistência do organismo contra infecções. Os brócolis possuem elevados níveis de vitaminas

A e C (ácido ascórbico), além de aminoácidos essenciais e minerais como cálcio (Ca), fósforo (P) e ferro (Fe). O repolho apresenta níveis elevados de Ca, P e magnésio (Mg) (KADER et al., 2001; RODRIGUES, 2005).

2.1.5 PERFIL DO CONSUMIDOR E FORMA DE CONSUMO

O Brasil possui cerca de 208 milhões de habitantes e caracteriza-se como um dos maiores mercados consumidores do mundo. Do total de olerícolas produzidas no país, 80% destinam-se ao consumo interno e somente 20% são exportadas para mais de 200 países (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2007). O mercado de olerícolas está cada vez mais competitivo e exigente e o produtor deve procurar atender às exigências (em qualidade e aparência) dos produtos requisitados pelos consumidores finais. O produtor deve também procurar entender quem é seu público alvo, além de estar constantemente alinhado e atento às demandas de mercado, sazonalidade e às oscilações da economia e política, fatores essenciais para o direcionamento mais adequado da produção (SOUZA, 2005).

O perfil dos consumidores de olerícolas mudou nos últimos anos, principalmente devido ao aumento da participação da mulher no mercado de trabalho e à busca por dietas consideradas mais equilibradas e saudáveis. No entanto, as exigências devem ir além do consumo de produtos de qualidade, com a conscientização de que os produtores têm que se preocupar em produzir alimentos que não causem danos à saúde do consumidor e prejuízos ao meio ambiente (MINAMI, 1999; SOUZA, 2005). Segundo Sato et al. (2008), o padrão de consumo pode variar dependendo da renda familiar, escolaridade, ocupação e bairro em que reside. Essas informações podem ser obtidas a partir de recenseamentos e repassadas para os produtores e empresas do ramo alimentício para otimizar os seus produtos, aumentar as vendas e conseqüentemente os lucros (ANDREUCCETTI, FERREIRA & TAVARES, 2005).

As olerícolas são subdivididas em quatro grupos, de acordo com suas partes comestíveis: (i) raízes, bulbos e tubérculos, os quais representam 40% de toda a produção nacional, distribuídas em onze culturas principais; (ii) hortaliças frutos, que representam 37% da produção nacional, divididas em onze culturas principais; (iii) hortaliças folhosas, que representam 16% da produção nacional; e (iv) melancia, melão e morango, representando 7,5% da produção nacional (FILGUEIRA, 2008).

O consumidor tem por costume comprar produtos de acordo com a aparência, cheiro, tamanho e embalagem. Devido, principalmente, à participação da mulher no mercado

de trabalho, os consumidores têm procurado alternativas cada vez mais práticas e rápidas para o preparo dos alimentos. Assim, o setor das olerícolas tem buscado novas alternativas para se ajustar aos novos consumidores, oferecendo produtos higienizados, processados, embalados e congelados (RIBEIRO, 1996). Portanto, com o intuito de se adaptar às novas exigências do consumidor, intensificaram-se as pesquisas voltadas para o melhoramento genético, visando, principalmente, produtos menores e mais saborosos. Assim, surgiram o tomate cereja, mini cenouras, couve-de-Bruxelas, alface americana, brócolis de cabeça, entre outras (SOUZA, 2005).

Outro setor que se destaca, no Brasil, tanto em importação quanto em exportação, é o mercado das olerícolas exóticas e com variação de coloração, tais como: pimentas coloridas, berinjela branca, abobrinha amarela, agrião (*cressonete*), endívias (chicória amargo-adocicada), *radicchio* (chicória vermelho arroxeadada), alface *red fire* (alface de folha crespa e vermelha) (JUNQUEIRA & LUENGO, 2000). Algumas redes varejistas oferecem novos produtos, visando atrair clientes do mercado tradicional, sendo que alguns mercados mais sofisticados chegam a oferecer mais de 300 variedades de produtos com diversas cores e tamanhos. As vendas de produtos de hortifrúti representam em média de 10% a 15% do faturamento das grandes lojas (JUNQUEIRA, 1999; SOUZA, 2005).

Devido à rápida deterioração das olerícolas *in natura*, torna-se cada vez mais difícil o abastecimento dos grandes centros consumidores, sendo necessária a reestruturação dos canais de distribuição para uma comercialização mais eficiente (LOURENZANI & SILVA, 2004). A alternativa que os países desenvolvidos vêm adotando é substituir parte dos produtos *in natura* pelos industrializados ou semiprocessados, sem conservantes químicos, permitindo a estocagem (COELHO, 2007). No Brasil, os primeiros produtos industrializados surgiram no final da década de 1980, quando houve um aumento no consumo e demanda nos *fast foods*, hotéis e restaurantes, com consequentes necessidades de um menor tempo de preparo, redução de perdas e maior padronização de qualidade (FERREIRA, 2000). Além disso, os produtos processados podem ter um valor agregado de até 200%, quando comparados com os não processados. No caso dos produtos higienizados, minimamente processados (descascados e cortados) e embalados a vácuo, o valor agregado pode chegar a 150% (MORETTI, 1999). E nesse setor ganham destaque algumas olerícolas como: couve, brócolis, rúcula, repolho, cenoura, beterraba, entre outras (SOUZA et al., 1998).

O mercado de produtos congelados é um dos setores com maior taxa de crescimento ao ano no mundo (25%). No Brasil, não é diferente. Esse setor cresce cerca de 30%

ao ano e estima-se que o faturamento interno tenha atingido a marca de R\$ 100 milhões (JUNQUEIRA & LUENGO, 2000).

As olerícolas minimamente processadas são uma outra alternativa moderna de consumo, apresentando as mesmas qualidades dos produtos frescos, mas com as vantagens de estarem prontas para o uso, além de ajudarem na redução dos desperdícios. Porém, esses alimentos são mais perecíveis quando comparados com sua matéria-prima devido, principalmente, a: maior taxa de respiração dos alimentos, o que intensifica as reações químicas ligadas à deterioração; maior proliferação bacteriana; e maior evaporação, o que ocasiona a murcha mais rápida das hortaliças (JUNQUEIRA & LUENGO, 2000). Apesar dessas desvantagens, sua produção tem sido estimulada devido à demanda crescente de alimentos semiprontos e sem conservantes químicos (VILELA & HENZ, 2000).

Outra importante forma de consumo são os produtos enlatados, que representam aproximadamente 4% do faturamento da indústria de alimentos. Outros segmentos englobam as hortaliças desidratadas ou liofilizadas com um consumo anual de aproximadamente 1,3 toneladas (VILELA & HENZ, 2000). No entanto, esses produtos estão sendo utilizados principalmente como: (i) corantes naturais de massas, sorvetes e iogurtes (beterraba, espinafre); (ii) condimentos e temperos para molhos, patês, queijos e sopas; (iii) cubos, flocos ou pós utilizados em molhos e sopas; e (iv) acompanhamentos de produtos cárneos como batata, cenoura, pimentão, couve e repolho (JUNQUEIRA & LUEGO, 2000).

2.1.6 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SOCIAL

A produção de olerícolas tem se mostrado expressiva no mundo inteiro, com uma área plantada estimada de 89 milhões de ha e produção 1,4 bilhões de toneladas (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2017). As condições edafoclimáticas fazem do Brasil uma potência para o desenvolvimento do agronegócio. O país possui aproximadamente 400 milhões de hectares agricultáveis, sendo que apenas 65 milhões de ha são explorados para atividades agrícolas (EMBRAPA, 2017). Assim, em 2017, o agronegócio brasileiro foi responsável por 23,5% do Produto Interno Bruto (PIB), sendo a maior participação dos últimos 13 anos. Além disso, o agronegócio representa 48% das exportações totais do país. Nesse mesmo ano, o agronegócio gerou aproximadamente 46 mil novos postos de trabalho (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL - CNA, 2017).

Um dos setores inseridos no agronegócio brasileiro é a olericultura, que apresenta algumas peculiaridades, tais como: alta produção com rendimentos consideráveis; necessidade de pequenas áreas de produção; possibilidade de cultivo de mais de uma centena de espécies, que podem ser produzidas em áreas menores de 10 ha e necessidade constante de mão de obra (intensiva) desde a semeadura até a colheita (VILELA & HENZ, 2000; MELO, 2006).

No Brasil, 60% das olerícolas são produzidas pela agricultura familiar. De acordo com a lei 11.326 de 24 de julho de 2006, para que seja caracterizada agricultura familiar, a propriedade deve ter no máximo quatro módulos fiscais (que variam de acordo com os municípios), e a mão de obra utilizada tem que ser predominantemente familiar, assim como a base de sustentação e renda devem estar vinculadas ao próprio empreendimento (MACEDO, 2014). No Brasil, é representada por cerca de 14 milhões de pessoas, o que corresponde a 77% da mão de obra que compõe agricultura, além de ocupar uma área de mais de 80 mil ha. Este setor é responsável pela produção de 70% dos alimentos que chegam à mesa dos brasileiros, e responde por 10% do PIB (GABOARDI JUNIOR, 2013). Além disso, a agricultura familiar é muito importante para o Brasil, uma vez que: (i) está vinculada aos aspectos de segurança alimentar e nutricional; (ii) preserva os alimentos tradicionais; (iii) contribui para uma alimentação mais balanceada; e (iv) impulsiona as economias locais e tem potencial para geração de emprego e renda (HERBERLÊ et al., 2017).

As olerícolas geram receitas líquidas mais elevadas, por área, quando comparadas a outras culturas temporárias, com uma média de 2 a 25 mil dólares por ha, enquanto outras culturas geram cerca de 500 dólares por ha (VILELA & HENZ, 2000; GOMES et al., 2016).

O Brasil, atualmente, está entre os dez maiores produtores mundiais de olerícolas, sendo a China o maior produtor (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS, 2014; INCAPER, 2017). A produção brasileira de olerícolas tem apresentado constante expansão. Somente em 2006, esta girou em torno dos 17 milhões de toneladas, ocupando uma área plantada de 771 mil ha. Em 2008, a produção nacional de olerícolas folhosas, flores e condimentares se concentrou em 5.642 propriedades rurais, sendo que as culturas da alface, couve, brócolis, repolho e couve-flor representaram 74%. Em 2011, a área plantada somente com olerícolas ultrapassou 800 mil ha, com uma produtividade estimada em 19 milhões de toneladas, sendo quatro milhões de toneladas produzidas somente no Estado de São Paulo. A produção nacional de olerícolas, nos últimos 10 anos, cresceu 33% e a área plantada foi reduzida em 5% com um incremento de produção de 38% (SILVA et al., 2015).

Segundo a Associação Brasileira de Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM), no ano de 2012, foram produzidas aproximadamente 17 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 665 mil ha que gerou 2 milhões de empregos diretos, apenas com as 18 principais olerícolas, incluindo couve, couve-flor, brócolis e repolho (ABCSEM, 2016). Os dados mais atualizados da produção brasileira de olerícolas são de 2015, com 18 milhões de toneladas produzidas em uma área cultivada de cerca de 800 mil ha, o que representa um rendimento médio de 23 toneladas por ha, equivalente a 93 kg por habitante por ano (SILVA et al., 2015).

As regiões Sul e Sudeste concentram 60% da produção de olerícolas e a maior parte está ao redor dos grandes centros consumidores. As regiões Nordeste e Centro Oeste são responsáveis por 25% e a região Norte apresenta um cultivo ainda bastante modesto, sendo seu mercado abastecido pela produção das regiões Sul e Sudeste (MELO, 2006; CAMARGO FILHO, CAMARGO & ALVES., 2010).

Atualmente, 60% do escoamento das olerícolas são realizados pelas centrais de abastecimentos (CEASA), que atuam como intermediários, entre produtor e consumidor, na comercialização desses produtos. Porém, a participação dos supermercados tem crescido nos últimos anos (ACCARINI et al., 2000; VILELA & HENZ, 2000). As feiras livres são também um meio direto de comercialização entre produtor e consumidor final, sendo responsáveis por parte do escoamento desses produtos, uma vez que não necessitam de intermediários e o produtor pode obter uma maior margem de lucro (GRANDE et al., 2003).

Levantamentos econômicos, em 2013, indicaram que somente na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) foram movimentados seis milhões de reais, com a comercialização de hortaliças. Diante deste panorama, o Estado de São Paulo se firmou como líder na produção brasileira de olerícolas. Esse montante pode ser atribuído à possibilidade de cultivo e produção durante todo o ano, nos municípios do cinturão verde da grande São Paulo, suprindo as necessidades de uma região com um mercado consumidor com mais de 20 milhões de pessoas (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS, 2014; CAMARGO FILHO & CAMARGO, 2010).

Além de ser o maior produtor, o Estado de São Paulo ainda tem o maior mercado consumidor nacional. Em 2006, áreas com produção de olerícolas representavam quase 1% do total de 22 milhões de ha ocupados com culturas anuais, perenes, reflorestamentos e pastagens. Porém, o valor das olerícolas mais representativas foi estimado em dois bilhões de reais, que representou cerca de 8% do valor total da agropecuária paulista (TSUNECHIRO et al., 2006). Os principais municípios produtores no Estado de São Paulo são: Mogi das Cruzes, Sorocaba,

Itapeva, Jaboticabal, Itapetininga, Campinas, São João da Boa Vista, Catanduva e Araçatuba. As regiões de Sorocaba e Mogi-das-Cruzes são os maiores produtores de hortaliças tendo o repolho e a alface como as principais culturas, que representam 46,7% da área plantada (Figura 5) (CAMARGO, CAMARGO & CAMARGO FILHO, 2008).

A produção de olerícolas, assim como as demais culturas, exige um investimento financeiro inicial alto, uma escolha criteriosa da cultura ou variedade a ser plantada, que dependerá das condições edafoclimáticas do local, controle efetivo de pragas e doenças e avaliação dos custos de produção em função das oscilações de preços do mercado (INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA E EXTENÇÃO RURAL - INCAPER, 2017).

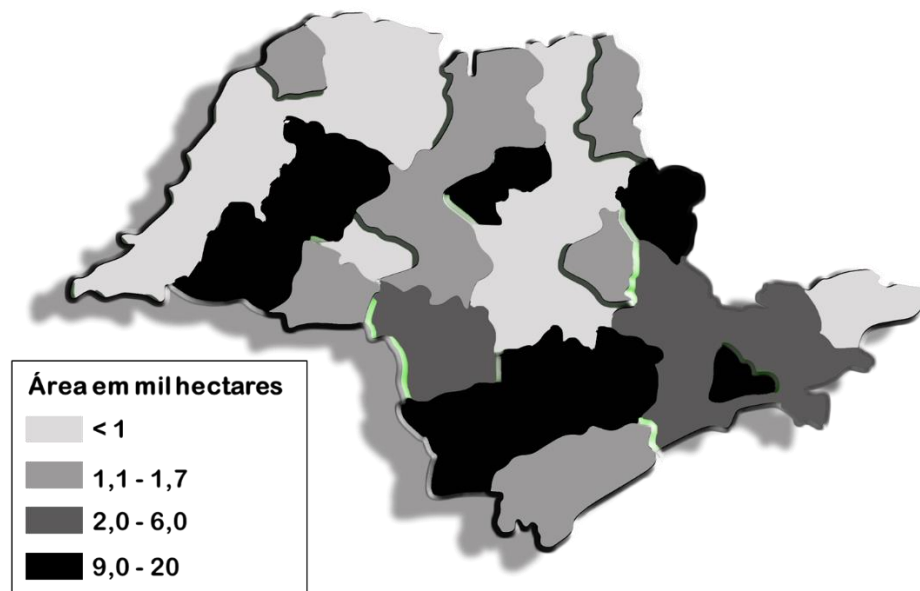


Figura 5 - Distribuição geográfica da produção de olerícolas no Estado de São Paulo por mil hectares. [FONTE: adaptada de Camargo, Camargo e Camargo Filho (2008)]

Na produção agrícola, de modo geral, há problemas de perdas tanto no campo como na pós-colheita, e as olerícolas são exceção. O principal fator é atribuído à produção desordenada e à falta de tecnologia, além de manuseio e armazenamento inadequados (COELHO, 2007). Porém, o Brasil busca alternativas para competir eficientemente no mercado interno e, para isso, os produtores têm adotado estratégias mais modernas, principalmente na colheita, nas embalagens e pós-colheita (VILELA & MACEDO, 2000). O mini processamento de hortaliças, por exemplo, é uma tecnologia interessante para diminuir perdas e aumentar o lucro do agricultor, pois visa ao aproveitamento total dos vegetais até mesmo os que não

atingiram padrão ideal para a comercialização. Além de agregar valor aos produtos, essa tecnologia permite uma comercialização direta, sem a participação de intermediários, o que possibilita a manutenção de preços constantes durante o ano, incrementando a renda do produtor (RABELLO, 1999). Tornando o país mais competitivo no mercado internacional (SOUZA et al., 1998).

Entre as olerícolas mais cultivadas no Brasil, destacam-se as do gênero *Brassica*, com destaque para as espécies: *Brassica oleracea* var. *acephala* (couve-de-folha), *B. oleracea* var. *italica* (brócolis), *B. oleracea* var. *capitata* (repolho), *B. oleracea* var. *botrytis* (couve-flor), *B. oleracea* var. *gemmifera* (couve-de-Bruxelas), *B. oleracea* var. *tranchuda* (couve-tranchuda), *B. oleracea* var. *gongylodes* (couve-rábano), *B. rapa* ssp. *pekinesis* (couve-chinesa), *B. rapa* (nabo), *B. rapa* (mostarda-de-folha). Em seguida, destacam-se *Raphanus sativus* (rabanete, rabanete branco, também conhecido como nabo), *Eruca sativa* (rúcula) e *Nasturtium officinale* (agrião) (AGRIANUAL, 2013).

Em geral, o custo de produção das brássicas é relativamente baixo quando comparado com outras olerícolas. Além disso, algumas brássicas são utilizadas na adubação verde, forragem, condimentos, produção de óleo, pickles e chucrutes (FERREIRA & RANAL, 1999).

No ano de 2006, somente no Estado de São Paulo, a produção de brássicas (repolho, brócolis, couve-flor, couve, couve-chinesa “também denominada de acelga” e couve-de-Bruxelas) foi de cerca de 390 mil toneladas em uma área plantada de aproximadamente 13.500 ha (Figura 6) (CAMARGO, CAMARGO & CAMARGO FILHO, 2008). Entre os anos de 2013 e 2017, as somas da produção dessas culturas totalizaram uma comercialização de aproximadamente 490 mil toneladas para consumo *in natura*, e dentre elas, o repolho foi o mais produzido, representando 62% do volume total comercializado (AGRIANUAL, 2013, 2015 e 2017) (Figura 7).

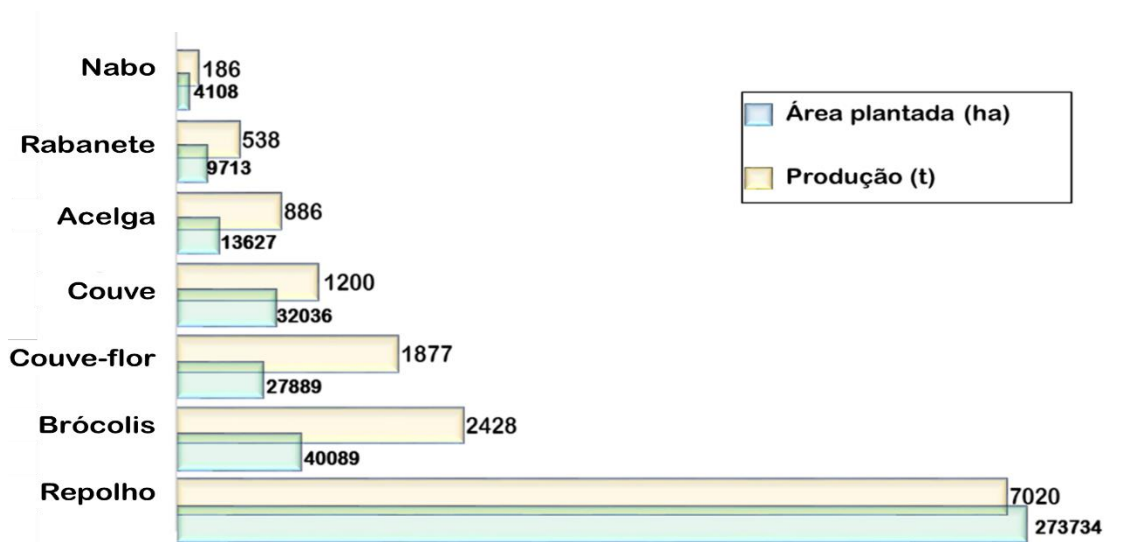


Figura 6 - Produção (em toneladas, t) e área plantada (em hectares, ha) das principais brássicas cultivadas no Estado de São Paulo. Obs.: Acelga neste caso se refere à espécie *Brassica rapa* spp. *pekinensis* (couve-chinesa). [FONTE: AGRIANUAL (2017)]

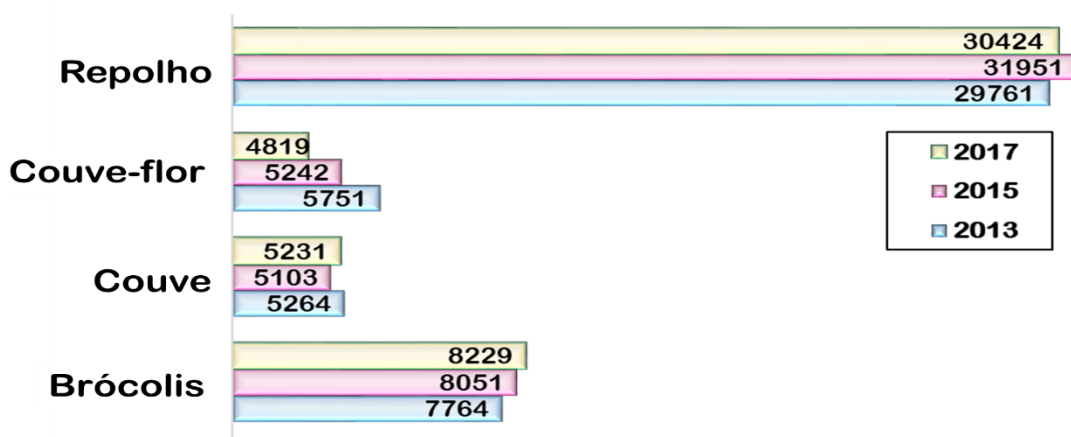


Figura 7 - Volume comercializado (toneladas) das principais brássicas durante os anos de 2013, 2015 e 2017 somente nas centrais de abastecimento do Estado de São Paulo. [FONTE: AGRIANUAL (2017)]

2.2 Turnip mosaic virus (TuMV): HISTÓRICO, OCORRÊNCIA, CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E MOLECULARES

No mundo, já foram descritas nove espécies de vírus em brássicas: *Turnip yellows virus* [ex - *Beet western yellows virus* (*Polerovirus*)]; *Cucumber mosaic virus* (*Cucumovirus*); *Radish mosaic virus* (*Comovirus*); *Ribgrass mosaic virus* (*Tobamovirus*); *Turnip crinkle virus* (*Carmovirus*); *Turnip yellow mosaic virus* (*Tymovirus*); *Cole latent virus* (*Carlavirus*); *Cauliflower mosaic virus* (*Caulimovirus*); ***Turnip mosaic virus*** (*Potyvirus*). O

turnip yellows virus (TuYV), o cauliflower mosaic virus (CaMV) e o turnip mosaic virus (TuMV) são considerados os vírus mais importantes, por causarem danos com consequentes prejuízos em brássicas em todo mundo (SHATTUCK, 1992; BELINTANI et al., 2002; STEVENS, MCGRANN & CLARK., 2008).

A primeira evidência de infecção com o TuMV foi relatada no ano de 1862, na França, em *Matthiola incana* (Brassicaceae), causando quebra de coloração das pétalas das flores. No entanto, o primeiro relato da ocorrência do TuMV foi feito nos Estados Unidos, em 1921, em cultivos de *Brassica rapa*. Na Europa, o primeiro relato desse vírus ocorreu no ano de 1930, no Reino Unido, em cultivos de *B. oleracea*. Entre as décadas de 1920 e 1940, houve relatos de TuMV em diversas partes do mundo (JENNER et al., 2002). No Brasil, o TuMV foi relatado pela primeira vez em 1972, em plantações comerciais de couve no Estado de São Paulo (COSTA et al., 1972).

Mais recentemente, estudos de filogenia com o genoma completo de isolados de TuMV sugerem que esse vírus infectava originalmente orquídeas silvestres do continente Europeu, e que, posteriormente, se disseminou para espécies de brássicas selvagens e cultivadas no Mediterrâneo, e consequentemente para outras regiões do planeta (YASAKA et al., 2017; NGUYEN et al., 2013). Atualmente, o TuMV está presente em regiões de clima temperado, subtropical e tropical da África, Ásia, Europa, Oceania e nas Américas (WALSH et al., 2002). No Brasil, o TuMV já foi descrito em brássicas no Estado de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná e Distrito Federal (Tabela 1).

Em levantamentos realizados por Walsh e Jenner (2002), em 28 países, o TuMV foi considerado o segundo vírus que causa os maiores prejuízos na produção de culturas de interesse econômico, ficando atrás somente do cucumber mosaic virus (CMV - *Bromoviridae*). O TuMV pertence à família *Potyviridae*, considerada a segunda maior família de vírus de plantas, que engloba 214 espécies de vírus, ficando atrás somente da família *Geminiviridae*, que atualmente abriga 468 espécies (INTERNATIONAL COMMITTEE ON VIRUS TAXONOMY - ICTV, 2018). Os vírus pertencentes à família *Potyviridae* infectam diversas espécies de plantas cultivadas e estão disseminadas ao redor do mundo. Em estudos de metagenômica, demonstrou-se que as espécies pertencentes a essa família também são comumente encontradas em plantas silvestres (ROOSSINCK, 2012). Além do gênero *Potyvirus*, outros nove estão classificados na família *Potyviridae* (*Bevemovirus*, *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*). No entanto, o gênero *Potyvirus* é mais numeroso, com 175 espécies descritas, incluindo o TuMV (ICTV, 2018; ADAMS et al., 2012).

Tabela 1 - Relação de trabalhos publicados no Brasil, que descrevem a identificação e ocorrência do turnip mosaic virus (TuMV) em diferentes hospedeiras

Hospedeira	Estado	Referências
<i>Armoracia rusticana</i> (raiz-forte)	SP	Eiras et al. (2007)
<i>Brassica carinata</i> (couve-da-Etiópia)	MG	Rodrigues et al. (1995)
<i>Brassica napus</i> (canola)	PR	Barbosa et al. (2000)
<i>Brassica rapa</i> (mostarda)	PR, SP	Lima et al. (1984);
<i>Brassica rapa</i> (couve-chinesa)	SP	Rodrigues et al. (2015)
<i>Brassica oleracea</i> (couve, couve-flor, repolho)	MG, DF, PR, SP	Colariccio et al. (2000); Costa et al. (1972); De Ávila et al. (1980); Lima et al. (1984)
<i>Eruca sativa</i> (rúcula)	PR, SP	Lima et al. (1984); Ribeiro-Junior et al. (2017)
<i>Nasturtium officinale</i> (agrião)	ES	Costa et al. (2010)
<i>Nasturtium sativum</i> (agrião d'água)	RJ	Boari et al. (2002)
<i>Raphanus sativus</i> (rabanete)	PR	Lima et al. (1984)
<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	SP	Costa (1974)
<i>Sinapis alba</i> (mostarda-branca)	RJ, PR	Kitajima et al. (1984); Lima et al. (1984)
<i>Spinacia oleracea</i> (espinafre)	PR	Lima et al. (1984)
<i>Tropaeolum majus</i> (capuchinha ou nastúrcio)	DF, SP	Amaral, Resende e Nagata (2001); Duarte et al. (2014)
<i>Lactuca sativa</i> (alface)	SP	Ribeiro-Junior et al. (2018)
<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> (acelga)	SP	Ribeiro-Junior et al. (2018)

Legenda: DF - Distrito Federal; PR - Paraná; MG - Minas Gerais; SP - São Paulo; ES - Espírito Santo; RJ - Rio de Janeiro. (FONTE: O autor)

O TuMV é o único potyvírus capaz de infectar brássicas. Suas partículas apresentam morfologia alongada e flexuosa, medindo cerca de 750 nm de comprimento, e seu genoma é constituído por um RNA de fita simples senso positivo (+ssRNA), com cerca de 9800 nucleotídeos. A extremidade 5' do RNA viral é ligada covalentemente a uma proteína viral (VPg), enquanto a extremidade 3' é poliadenilada [cauda poli (A)]. Dez (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, Pro, NIb e CP) das onze proteínas virais são derivadas de uma única ORF, que codifica uma poliproteína de 345 kDa, e sofre processamento pós-traducional, por meio de clivagens (em *cis* e em *trans*) por proteases virais. Já a outra proteína viral (P3N-PIPO), de cerca de 25 kDa, é produto da tradução de uma pequena ORF sobreposta na região genômica correspondente à proteína P3 (Figura 8) (CHUNG et al., 2008; WALSH et al., 2002; ADAMS et al., 2012). Os potyvírus expressam suas proteínas, com exceção da P1, HC-Pro e P3N-PIPO, em uma proporção equimolar, o que exige estratégias múltiplas para regular a síntese proteica em cada estágio do ciclo infeccioso (IVANOV et al., 2014).

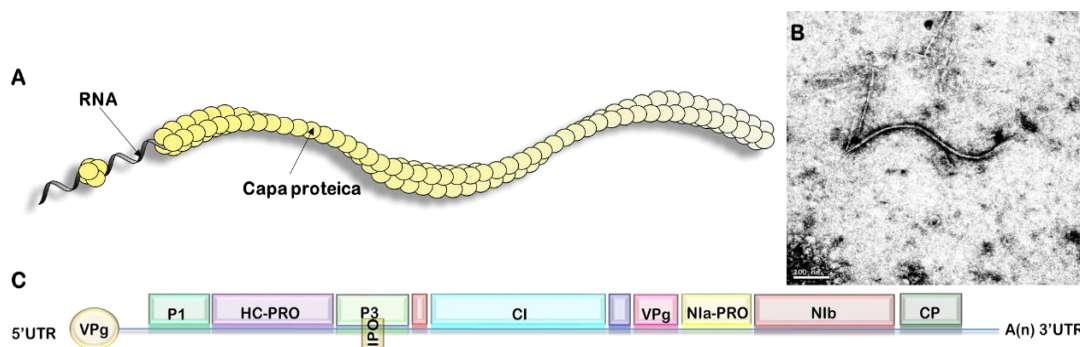


Figura 8 - (A) Representação esquemática da morfologia alongada e flexuosa da partícula dos membros da família *Potyviridae* (FONTE: O autor); (B) Micrografia eletrônica de transmissão de uma preparação em contrastação negativa (*leaf-dip*) de extrato foliar de mostarda (*Brassica rapa*) infectada pelo TuMV, evidenciando a presença de uma partícula alongada e flexuosa com cerca de 750 nm de comprimento (FONTE: Dr. Elliot W. Kitajima); (C) Representação esquemática do genoma de um potyvírus, com a indicação nas caixas coloridas das onze proteínas virais, além do terminal 5' não traduzido (5' UTR) ligado covalentemente à proteína VPg e o terminal 3' não traduzido (3' UTR) poliadenilado. (FONTE: O autor)

O TuMV, ao contrário da maioria dos potyvírus, apresenta uma ampla gama de hospedeiros, podendo infectar mais de 300 espécies de plantas pertencentes a 43 famílias de dicotiledôneas, incluindo Brassicaceae, Fabaceae, Solanaceae, Amaranthaceae, Asteraceae e Cucurbitaceae, além de infectar espécies de monocotiledôneas (TOMLINSON, 1970; WALSH et al., 2002). O TuMV pode infectar todas as espécies de brássicas, comerciais ou da vegetação espontânea, sendo que os sintomas induzidos podem variar de acordo com as interações das espécies e/ou variedades do hospedeiro, das estirpes do vírus e dos fatores ambientais (SHATTUCK, 1992). Especificamente com relação aos fatores ambientais, a temperatura tem importante influência na expressão dos sintomas do TuMV, com um ótimo que varia entre 18°C e 28°C (CHUNG et al., 2015). Além disso, Chung et al. (2015) demonstraram que quando submetido a temperaturas inferiores a 13°C, por um período de 45 dias, o TuMV não é capaz de infectar sistemicamente plantas de couve-chinesa.

Os sintomas foliares mais comuns induzidos pelo TuMV em brássicas são: clareamento de nervuras, mosaico, bolhas, anéis cloróticos ou necróticos (Figura 9). O TuMV pode causar também redução do tamanho e deformações severas na planta, comprometendo a formação da cabeça e necrose em *B. oleracea* var. *capitata* (repolho) e *B. rapa* ssp. *pekinensis* (couve-chinesa), além de redução do volume e tamanho da inflorescência nas variedades *italica* (brócolis) e *botrytis* (couve-flor) (Figura 10) (TOMLINSON, 1970). Em estudos realizados com repolho, em casa de vegetação, as plantas inoculadas com o TuMV apresentaram perda de peso de vinte vezes quando comparadas com os controles não inoculados (SPENCE et al., 2007). Constatou-se também que, muitas vezes a infecção transcorre de maneira assintomática, o que facilita a disseminação do vírus pelo intercâmbio de plantas e mudas (COLARICCIO et al.,

2000). Em plantas ornamentais como *Cheiranthus cheiri*, o vírus pode causar redução da concentração de antocianina das pétalas, induzindo quebra de coloração, além de estrias e manchas nas flores (KRUCKELMANN & SEYFFERT, 1970; PONTIS, 1973).

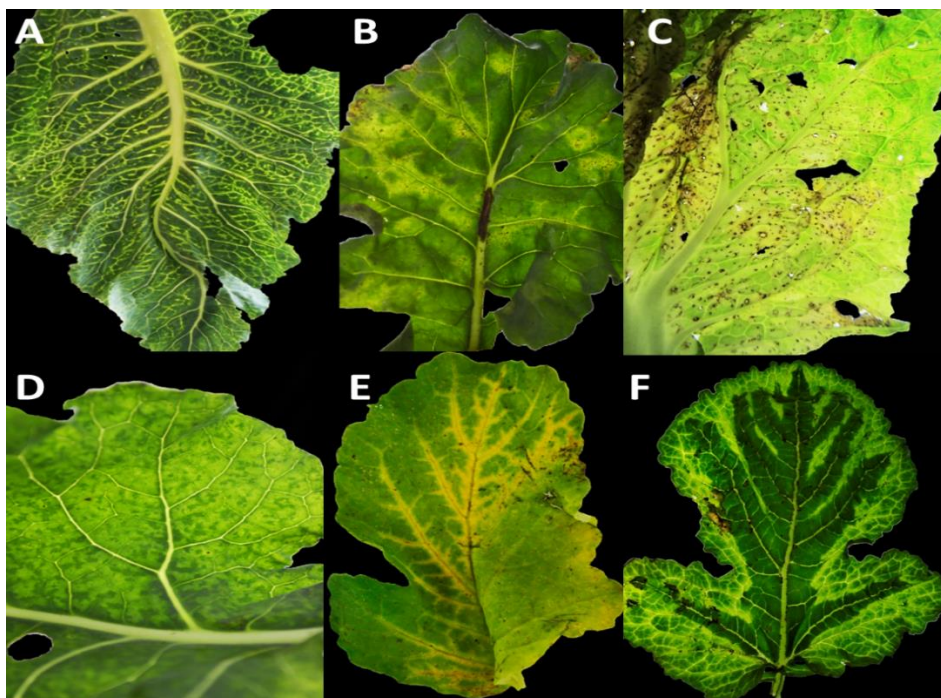


Figura 9 - Sintomas induzidos pelo turnip mosaic virus (TuMV) em brássicas cultivadas e da vegetação espontânea: (A) clareamento de nervuras e leve deformação foliar em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*); (B) manchas e anéis cloróticos em brócolis (*B. oleracea* var. *italica*); (C) Pontos necróticos e mosaico em couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *pekinensis*); (D) mosaico em brócolis; (E) amarelecimento acompanhando as nervuras (*vein banding*) em nabiça (*Raphanus raphanistrum*); (F) mosaico das nervuras (*vein banding*) em nabiça. (FONTE: O autor)



Figura 10 - Campos de produção de couve-chinesa (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) com elevada incidência de plantas infectadas pelo turnip mosaic virus (TuMV), com danos estimados de produção de 60%. (A) Campo de produção localizado no município de São José do Rio Pardo, SP, com destaque, em primeiro plano, para uma planta de couve-chinesa infectada por um isolado de TuMV com sintomas severos de pontos necróticos, mosaico e redução do crescimento (FONTE: O autor); e (B) Campo de produção situado no município de Biritiba Mirim, SP, com detalhe de uma planta de couve-chinesa subdesenvolvida infectada por um isolado de TuMV. (FONTE: Dr. Marcelo Eiras)

Em função da sua variabilidade genética, devido, principalmente, ao acúmulo de mutações (cerca de 10^{-3} substituições de nucleotídeos por ano), que tem reflexo no comportamento biológico (virulência e capacidade de infectar hospedeiras diferenciais), os isolados de TuMV, ao longo dos anos, têm sido classificados em diferentes estirpes e/ou patotipos (GIBBS et al., 2015). A primeira descrição de estirpes do TuMV foi proposta por Yoshii (1963), separando-as em: isolados que causavam sintomas brandos em repolho e em *Nicotiana glutinosa* e isolados que causavam sintomas de necrose e manchas em folhas de repolho. Posteriormente, McDonald e Hiebert (1975) determinaram um círculo de hospedeiros para diferenciar isolados de TuMV, sendo classificados como: estirpe tipo I (*cabbage*), aqueles isolados que causavam sintomas em todas as brássicas e mosaico (sistêmico) em *N. glutinosa* e estirpe tipo II (*ordinary*), para os isolados que induziam sintomas somente em algumas brássicas e pontos necróticos locais em *N. glutinosa*.

Alguns anos depois, foi adotada uma classificação de acordo com o círculo de hospedeiros (espécies e/ou cultivares) e tipos de sintomas induzidos nas plantas, sendo possível classificar oito estirpes de TuMV, de acordo com as diferenças de sintomas induzidos em variedades de couve-chinesa (PROVVIDENTI, 1980). Walsh (1989), utilizando canola (*B. napus*) e rutabaga (*B. napus* var. *napobrassica*) propôs a diferenciação de isolados europeus e canadenses em quatro grupos. Fujisawa (1990), utilizando cultivares de repolho e nabo forrageiro, diferenciou nove estirpes de TuMV no Japão. Diversos outros estudos, com o objetivo de se identificar estirpes de TuMV, foram realizados posteriormente na Colômbia, Canadá, Reino Unido, Argentina, Hungria, Iugoslávia, Marrocos, Estados Unidos, Polônia, Tailândia, Índia, Alemanha e China (SHATTUCK, 1992). Jenner e Walsh (1996) propuseram uma classificação de isolados de TuMV em patotipos, de acordo com a reação de uma série de linhagens de *B. napus* (Rape S6, Rape R4, Swede 165 e Swede S1). Após avaliarem 124 isolados coletados em diferentes países da Europa, Ásia, África, América do Norte e Oceania, os autores classificaram os isolados de TuMV em 12 patotipos, de acordo com o padrão de sintomas observados nessas linhagens, sendo a maioria (78% dos isolados) classificada como patotipo 1, 3 ou 4.

O TuMV pode ser diferenciado das outras espécies de potyvírus utilizando anticorpos monoclonais, específicos para a região N-terminal da capa proteica, considerada uma das regiões mais variáveis dos potyvírus (SHUKLA et al., 1988). Em estudo realizado por Jenner et al. (1999), avaliando 41 isolados de TuMV, provenientes de diferentes regiões e hospedeiras, e um painel composto por 30 anticorpos monoclonais, foi possível subdividir os isolados virais em três diferentes sorotipos denominados: (i) “sorotipo predominante”,

composto por isolados de TuMV de brássicas da Europa, que resultou no maior grupo com 30 isolados; (ii) “JPN 1”, constituído pelos isolados de TuMV de *radish* da Ásia; e (iii) “BEL 1”: constituído por um único isolado de TuMV de *Rorippa nasturtium-aquaticum* da Bélgica. No entanto, os autores não observaram qualquer relação entre os sorotipos e os patotipos.

Além de diferentes patotipos e sorotipos, Oshima et al. (2002) diferenciaram filogeneticamente isolados de TuMV, de acordo com suas hospedeiras em quatro grupos distintos: (i) [(B)] – isolados de TuMV que não infectam *Raphanus*, mas são capazes de infectar brássicas, sendo que algumas vezes a infecção transcorre de forma latente (assintomática); (ii) [B] – isolados que infectam a maioria das espécies de brássicas, expressando sintomas de mosaico, mas não são capazes de infectar *Raphanus*; (iii) [B(R)] – isolados que infectam a maioria das espécies de brássicas, expressando sintomas de mosaico e ocasionalmente infectam *Raphanus* sem a indução de sintomas; e (iv) [BR] – isolados de TuMV que infectam espécies de brássicas e *Raphanus* sistemicamente, expressando sintomas de mosaico.

2.3 TRANSMISSÃO E DISSEMINAÇÃO DO TuMV

Os vírus de plantas são considerados parasitas intracelulares obrigatórios, pois necessitam exclusivamente de células vivas e não são capazes de se disseminar de forma livre. Além disso, diferentemente das bactérias fitopatogênicas, não são capazes de estabelecer a infecção por meio de aberturas naturais das plantas como estômatos e lenticelas. E ao contrário de alguns fungos fitopatogênicos, que produzem enzimas que degradam a parede celular, os vírus não são capazes de penetrar ativamente as células hospedeiras. Além disso, a célula vegetal, diferentemente da célula animal, possui parede celular, que se apresenta como uma barreira natural, impedindo o contato do vírus com receptores da membrana celular, como ocorre nas primeiras fases das infecções virais em células animais. Para romper essa barreira e obter sucesso na primeira fase da infecção, ou seja, entrada na célula hospedeira, os vírus de plantas precisam penetrar a célula vegetal. Essa etapa que pode ser realizada por meio de inoculação mecânica (natural ou experimental), que devido a ferimentos ocasionados, principalmente, em células epidérmicas, o vírus tem acesso ao interior dessas células feridas, porém ainda vivas, iniciando o processo infeccioso. A entrada na célula hospedeira também pode ser realizada por meio de vetores (insetos, ácaros, nematoides, fungos e protozoários), que através dos processos de alimentação (ou infecção, especificamente no caso de fungos e protozoários) nas plantas, são capazes de introduzir as partículas virais no interior da(s) célula(s) hospedeira(s) (COSTA, 1998; HULL, 2014; BRAULT et al., 2010).

Alguns vírus, por apresentarem partículas com elevada estabilidade fora da célula, podem ser disseminados durante os tratamentos culturais pelo uso de ferramentas de corte contaminadas. Um dos modos mais eficientes de disseminação de vírus, no entanto, se dá pelo emprego de material propagativo (sementes, bulbos, colmos, tubérculos, estolões, mudas) infectado (COSTA, 1998; BRAULT et al., 2010). A transmissão por sementes, entretanto, dependerá da espécie do vírus e de sua hospedeira, tornando as taxas bastante variáveis. Somente 6% dos vírus de plantas conhecidos são transmitidos através de sementes (BRAULT et al., 2010).

Cerca de 50% dos vírus de plantas dependem de um vetor para serem transmitidos (FERERES & MORENO, 2009). Os vetores de vírus de plantas pertencem a quatro grandes grupos taxonômicos distintos: fungos, protozoários, nematoides e artrópodes (fitófagos), onde estão inseridos os insetos e ácaros (COSTA, 1998). Os insetos vetores pertencem a três ordens: Hemiptera (afídeos, cochonilhas, moscas-brancas e cigarrinhas), Coleoptera (besouros) e Thysanoptera (tripes). Porém, Hemiptera se destaca, sendo os vetores da subordem Sternorrhyncha, da qual fazem parte os afídeos (pulgões), as cochonilhas e as moscas-brancas, responsáveis por transmitir cerca de 50% dos vírus de plantas (FERERES & MORENO, 2009). Entretanto, para que um organismo seja considerado vetor, é necessário apresentar algumas características, tais como: (i) capacidade de romper a parede celular e chegar no citoplasma das células de diferentes tecidos; (ii) ter mobilidade frequente entre as plantas; e (iii) estabelecer uma interação biológica específica com o vírus (RACCAH et al., 2001; BRAULT et al., 2010).

As interações biológicas entre vírus e vetor são específicas e ocorrem em nível molecular, por meio do reconhecimento de proteínas virais estruturais como a capa proteica (CP) ou proteínas virais não estruturais, que funcionam como uma ponte entre a partícula viral e sítios de ligação do vetor, como ocorre com a HC-Pro de potyvírus, promovendo a ligação do vírus a regiões específicas no vetor (BLANC, DRUCKER & UZEST, 2014). Além disso, o vírus pode manipular seu vetor de forma indireta, por meio de modificações induzidas nas plantas como: (i) nas principais vias de defesa; (ii) na composição de aminoácidos da seiva; (iii) na emissão de compostos orgânicos voláteis; e (iv) na mudança de coloração das plantas, a partir de sintomas induzidos, que favorece a atratividade ou repelência do vetor (ZIEBELL et al., 2012; GUTIERREZ et al., 2013). A manipulação de forma direta ocorre por meio da alteração do comportamento do próprio vetor, que irá depender do modo de transmissão. Vírus transmitidos de modo circulativo, por exemplo, podem induzir mudanças que fazem com que seus vetores permaneçam na planta, formem colônia e migrem tardiamente para garantir a

máxima eficiência de transmissão (GUTIERREZ et al., 2013; BLANC, DRUCKER & UZEST, 2014). Porém, uma vez virulíferos, os vetores passam a ter preferência por plantas saudáveis, aumentando a chance de disseminação do vírus (BLANC, DRUCKER & UZEST, 2014). Bak et al. (2017) demonstraram que a proteína NIa-Pro de potyvírus, quando presente no vacúolo de *Nicotiana benthamiana* aumenta o desempenho reprodutivo de *Myzus persicae*. Por outro lado, a NIa-Pro não é encontrada em vacúolos de *N. tabacum* e estudos para determinar sua localização e o seu efeito sobre os afídeos vetores ainda são necessários para conhecer seu efeito em outros patossistemas.

2.3.1 AFÍDEOS E SUA IMPORTÂNCIA NA TRANSMISSÃO DO TuMV

Entre os insetos fitófagos, os afídeos se destacam como insetos-praga, por causarem danos diretos durante o processo de alimentação, debilitando a planta por meio da sucção constante de seiva e injetando saliva que pode conter substâncias fitotóxicas, provocando murcha, encarquilhamento das folhas e paralisação do desenvolvimento das plantas (GODFREY, ROSENHEIM & GOODELL, 2000). A secreção de uma substância açucarada (*honeydew*) é um atrativo para formigas, além de facilitar o desenvolvimento de alguns fungos ascomicetos (conhecidos popularmente como fumaginas) na superfície foliar, que impedem a atividade fotossintética das plantas (DEDRYVE, RALEC & FABRE, 2010; INOUE-NAGATA & NAGATA, 2002). Entre os 45 principais insetos que acometem as culturas de interesse econômico, 26% dos danos são causados por afídeos. Na Europa, esses insetos causam perdas econômicas anuais de 700, 850 e 2.000 mil toneladas nas culturas de milho, batata e beterraba, respectivamente (DEDRYVER, RALEC & FABRE, 2010).

Esses insetos podem assumir uma importância ainda maior quando estão associados à transmissão de vírus. Aproximadamente 200 espécies de afídeos são vetores de mais da metade dos vírus de plantas conhecidos (BLACKMAN & EASTOP, 2007; ILHARCO, 1992).

Os afídeos pertencem à família Aphididae, que abriga 600 gêneros (DIXON et al., 1987), com cerca de 4700 espécies, a maioria originária de regiões de clima temperado (BLACKMAN & EASTOP, 2007). Destes, 40% vivem totalmente ou parcialmente em árvores, 55% vivem em plantas herbáceas e 5% ainda não se têm informações sobre os hospedeiros. Em Aphididae estão incluídos 57% dos afídeos, descritos até o momento, sendo a maioria polífaga encontrada nos campos agrícolas (PECCOUND et al., 2010). Esses insetos somente foram considerados praga após sua introdução em regiões de clima tropical e subtropical. Atualmente,

no Brasil, já foram relatadas aproximadamente 144 espécies ocorrendo em plantas silvestres, plantas da vegetação espontânea e em muitas espécies de interesse econômico (PERONTI & SOUSA-SILVA 2002).

Os afídeos apresentam corpo mole, de formato oval, que pode variar de 4 a 7 mm de comprimento. Seu corpo apresenta coloração uniforme e é dividido em três partes (cabeça, tórax e abdome) (Figura 11) (MIYAZAKI, 1987). A coloração de algumas partes do corpo pode variar de castanha a negra, devido à decomposição de células mortas, que irá tornar a cutícula do seu exoesqueleto mais rígida e conseqüentemente mais escura (ILHARCO, 1992).

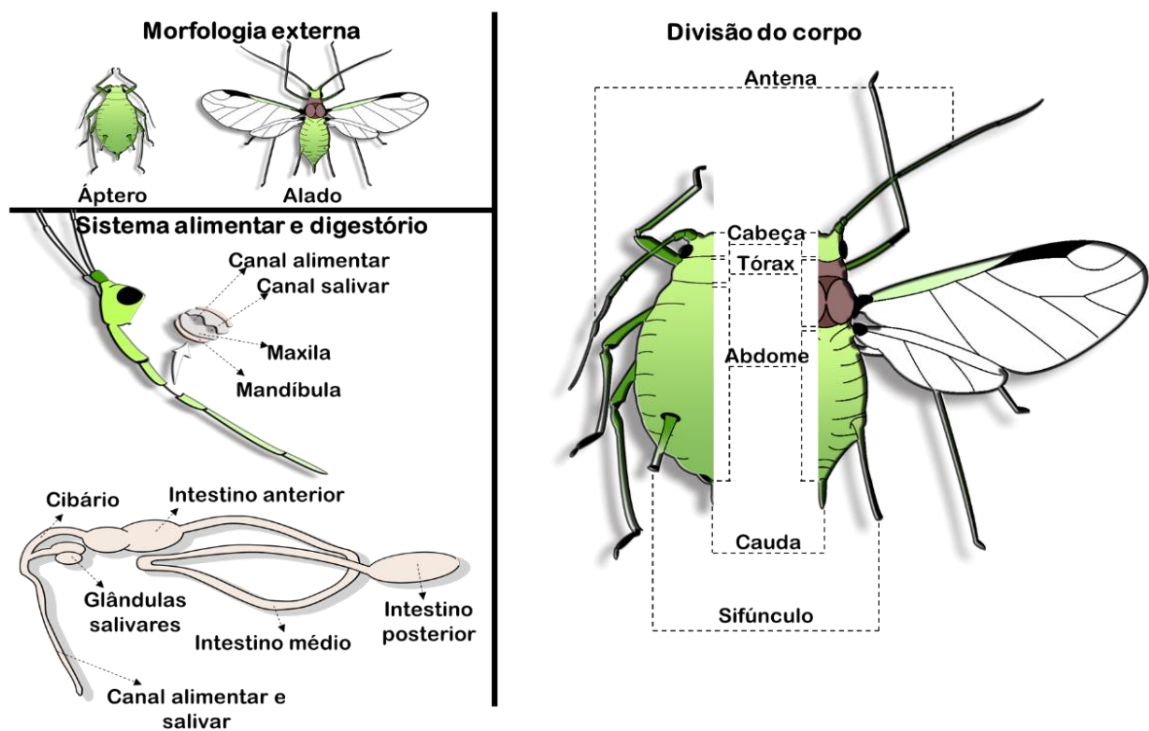


Figura 11 - Morfologia externa, interna e divisão do corpo dos afídeos. (FONTE: O autor)

Os adultos podem ser ápteros ou alados, sendo que a indução de asas irá depender da superlotação populacional (das colônias) e da senescência das plantas hospedeiras. Em função de alçar voos a longas distâncias (principalmente quando são carregados por ventos fortes), os indivíduos alados são considerados os mais importantes vetores do ponto de vista epidemiológico (INOUE-NAGATA & NAGATA, 2002; RIBBANDS, 1963).

A reprodução dos afídeos pode ser de forma sexuada ou assexuada (partenogênese). Com relação às hospedeiras, o ciclo de vida desses insetos é classificado em

monocíclico, quando não alternam de hospedeiro, e heterocíclico, quando há alternância de hospedeiros (WILLIAMS & DIXON, 2007). De acordo com o tipo de progênie, as espécies de afídeos encontradas em regiões de clima temperado são geralmente homocíclicas, ou seja, apresentam ciclo de vida completo, em que uma geração de machos e fêmeas sexuais é sucedida por gerações de fêmeas partenogênicas. As espécies presentes nas regiões tropicais e subtropicais são classificadas como anolocíclicas (ciclo incompleto), sendo que sua reprodução ocorre exclusivamente por partenogênese telítoca, em que óvulos não fecundados darão origem somente a fêmeas (Figura 12) (DIXON, 1977; BLACKMAN, 1974; CARVER, GROSS & WOODWARD, 1991).

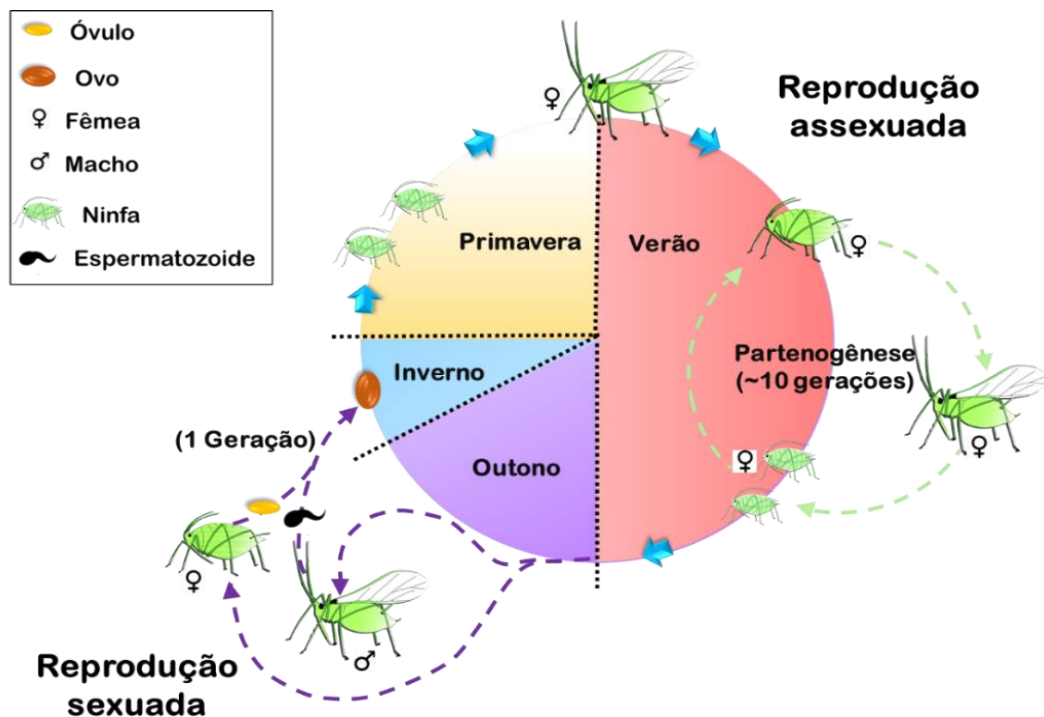


Figura 12 - Ciclo completo de reprodução de afídeos em regiões de clima temperado. (FONTE: O autor)

Possuem uma alta taxa de reprodução, devido ao longo período da fase assexuada (40-100 proles de fêmeas em média), combinado com o tempo mais curto entre as novas gerações. Isso leva a altas taxas de crescimento populacional diário, que varia de 0,1 a 0,4 dependendo da temperatura (SIMON et al., 1991). O aumento ou decréscimo das populações das diferentes espécies de afídeos estão diretamente relacionadas com as oscilações de temperatura, pluviosidade e condições nutricionais das plantas hospedeiras (ROBERT, 1987). Esses insetos apresentam desenvolvimento hemimetábolo, ou seja, as ninfas são

semelhantes aos adultos. Geralmente, os afídeos apresentam quatro instares para chegar na fase adulta e a partir do terceiro instar já é possível identificar os adultos alados, pela presença das tecas alares (ILHARCO, 1992).

O aparelho bucal é do tipo picador sugador, adaptado para penetrar os tecidos e sugar seiva dos vasos do floema (Figura 11). São capazes de se alimentar nos vértices vegetativos, folhas, raízes, caules e raramente nas flores e frutos (ILHARCO, 1992). Para se alimentar, os afídeos penetram os estiletes no espaço intercelular, e algumas vezes, ocorrem penetrações intracelulares, com o objetivo de chegar ao floema dos hospedeiros (DIXON, 2009). De acordo com o hábito alimentar, podem ser divididos em: monófagos (quando se alimentam de plantas de uma mesma família botânica); polífagos (quando se alimentam de plantas de diferentes famílias) e oligófagos (quando apresentam reduzido número de hospedeiras) (ILHARCO, 1992).

Para se alimentar e estabelecer colônia, os afídeos precisam encontrar suas hospedeiras. No entanto, durante o voo, são incapazes de identificá-las e, para que isso ocorra, um dos estímulos recebidos é o contraste do verde das plantas com a cor do solo e a energia refletida entre o solo e a vegetação (KENNEDY, SBOOTH & KERSHAW, 1961). Ao pousar em uma determinada planta, um dos reconhecimentos iniciais é realizado por meio de quimiorreceptores e mecanorreceptores (sensilas) localizados nas antenas e lábio (uma das peças que compõem o aparelho bucal) (FERERES & MORENO, 2009). Após esse reconhecimento inicial, o afídeo inicia o processo de alimentação, realizando as primeiras picadas, conhecidas por picadas de prova. Elas são realizadas em um curto período (normalmente, menos de um minuto) e se limitam às células da epiderme e parênquima (mesofilo) das folhas. As picadas de prova determinam o reconhecimento definitivo da hospedeira, quando o conteúdo celular é ingerido pelo afídeo e, ao passar pelo cibário, chega às papilas sensoriais. Caso a planta não seja hospedeira, o afídeo recolherá seus estiletes e realizará pequenos voos à procura da hospedeira favorável. Ao encontrar a hospedeira (depois de fazer novas picadas de prova), o afídeo alonga seus estiletes até os vasos do floema e inicia a alimentação e o estabelecimento de uma nova colônia (NETO et al., 1976). Após o estabelecimento da colônia, podem realizar dois tipos de movimentos conhecidos como dispersão e migração. O primeiro movimento é realizado por ninfas e ápteros que se redistribuem nas plantas, por meio das pontes formadas entre as folhas, e pode ser desencadeado por feromônios de alarme, que indicam a presença de um inimigo, ou por terem pousado em uma planta debilitada (ROBERT, 1987). Já a migração, desencadeada pela deterioração da planta ou por condições climáticas desfavoráveis, é realizada pelos afídeos alados para outra

planta ou para novas áreas, em busca de novas hospedeiras (DIXON, 1977; EASTOP, 1977; DIXON, 1990).

2.3.2 MODOS DE TRANSMISSÃO

Durante os anos de 1956 a 1996, foram propostos diversos sistemas de classificação para os modos de transmissão de vírus, que se baseavam nos tempos de retenção e rotas do vírus no corpo do vetor (WATSON & ROBERTS, 1953; KENNEDY, DAY & EASTOP, 1962; PIRONE & BLANC, 1996). Atualmente, utiliza-se a classificação proposta por Harris (1979), que divide os modos de transmissão em: circulativo (propagativo e não propagativo) e não circulativo (semipersistente e não persistente) (Figura 13).

No modo de transmissão **circulativo**, o vírus é adquirido no floema da planta durante o processo de alimentação do vetor. Para que o vetor esteja apto a transmitir o vírus, algumas barreiras devem ser transpostas. A primeira barreira que o vírus deve vencer é a passagem do intestino para o interior da cavidade do inseto (hemocele). A segunda barreira a vencer corresponde à passagem da hemocele para as células das glândulas salivares acessórias. Fica evidente que para transpor essas barreiras deve haver uma elevada especificidade nas interações vírus-vetor. Esse modo de transmissão tem como características tempos longos de aquisição e inoculação (horas/dias) e o período de latência pode variar de horas a semanas (Figura 13) (NG & PERRY, 2004; BRAGARD et al., 2013). A transmissão circulativa é subdividida em **propagativa**, quando o vírus se replica nas células do vetor, e **não propagativa**, quando o vírus somente circula no corpo do inseto, mas não se replica (BRAGARD et al., 2013).

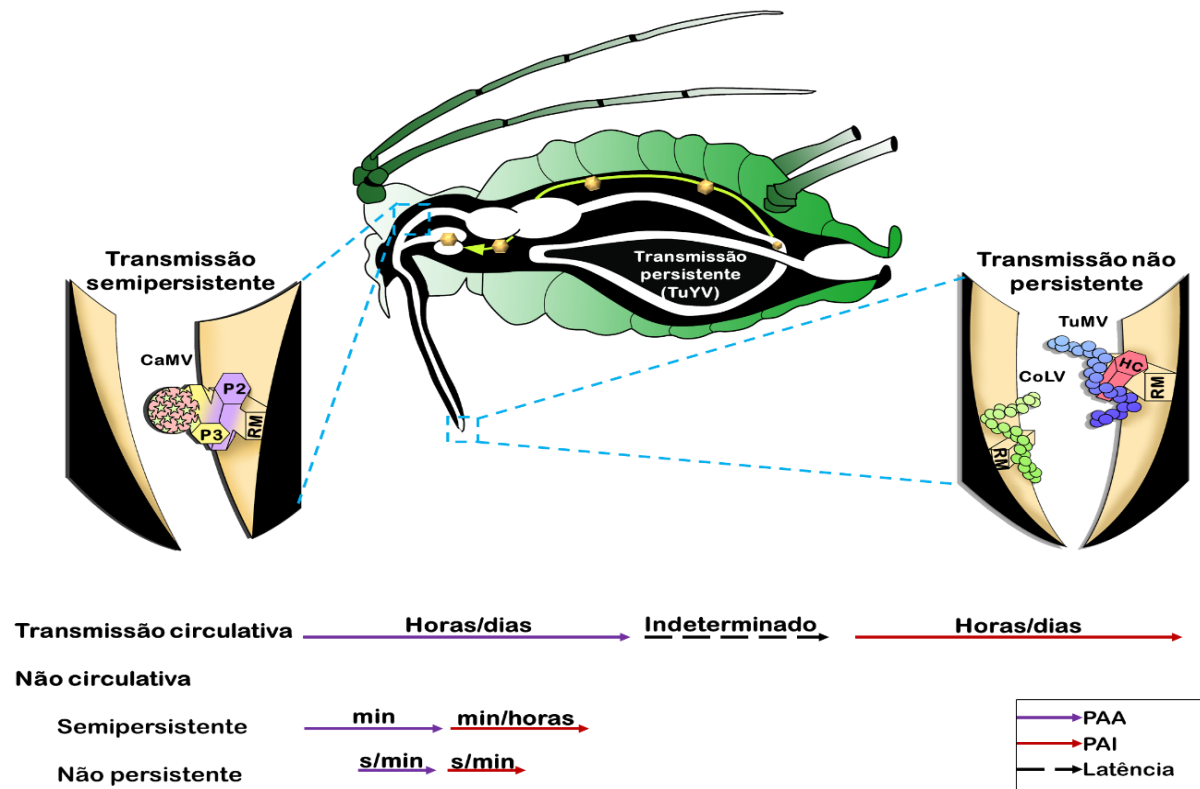


Figura 13 - Modos de transmissão de vírus de plantas por afídeos vetores: circulativo (propagativo e não propagativo) e não circulativo (semipersistente e não persistente). No centro, está representado um afídeo em corte longitudinal, com a indicação dos locais de interação (receptores de membrana, RM) das partículas virais em cada modo de transmissão. Na transmissão semipersistente, à esquerda, está representada a interação entre o cauliflower mosaic virus (CaMV) e o cibário, porção do aparelho bucal do afídeo. As proteínas virais, P2 e P3, fazem uma ponte entre a partícula viral e RM do cibário do afídeo. Na transmissão não persistente, à direita, estão representadas as interações de dois vírus de brássicas, o cole latent virus (CoLV) e o turnip mosaic virus (TuMV). Acredita-se que as partículas do CoLV se ligam diretamente a um RM localizado na ponta do estilete do afídeo (não se conhecem os detalhes dessa interação). No caso do TuMV, a ligação entre os RM localizados na ponta do estilete do inseto e a partícula viral depende da interação entre a capa proteica (CP) e a proteína do componente auxiliar (*helper component*, HC). A transmissão persistente (circulativa) está representada no centro, exemplificada pelo turnip yellows virus (TuYV). Nesse modo de transmissão, o vírus circula no corpo do inseto, passando, inicialmente, do intestino posterior para a hemocele, atingindo as glândulas salivares acessórias para ser então transmitido. O período de latência corresponde, nesse caso, ao tempo que o vírus leva desde a sua aquisição para circular no corpo do inseto até atingir as glândulas salivares acessórias e poder ser transmitido. Nos modos de transmissão semipersistente e não persistente, não há período de latência. Na transmissão de modo persistente, o período de acesso à aquisição (PAA) pode variar de horas a dias, uma vez que o afídeo necessita alongar os estiletes até as células do floema para adquirir o vírus. O período de acesso à inoculação (PAI) também varia de horas a dias. Na transmissão semi-persistente, o PAA é de minutos, enquanto o PAI varia de segundos a minutos. No modo de transmissão não-persistente tanto o PAA quanto o PAI varia de segundos a minutos. (FONTE: O autor)

Como exemplo de transmissão **circulativa não propagativa**, pode-se citar o turnip yellows virus (TuYV, pertencente ao gênero *Pterovirus*, família *Luteoviridae*), um vírus restrito ao floema, que infecta brássicas. As partículas virais, adquiridas pelo afídeo nas células do floema, são transportadas para as células do intestino posterior (*hindgut*) através de um processo de endocitose, mediado por receptores da membrana plasmática. No citoplasma, as

vesículas formadas pelo processo de endocitose migram até se fundirem em uma vesícula maior denominada endossoma. Nessa fusão, as partículas virais são liberadas no lúmen do endossoma e rearranjadas em vesículas tubulares. As vesículas tubulares, por sua vez, ligam-se à membrana basal e as partículas virais são liberadas na hemocele do afídeo (Figura 14A). Os afídeos abrigam bactérias endossimbiontes, do gênero *Buchnera*, em células especializadas do seu abdome, que fornecem os aminoácidos que não são capazes de sintetizar. Essas bactérias desempenham um papel fundamental na transmissão de vírus de modo circulativo. Porém, ainda não se sabe se elas protegem o vírus contra o sistema de defesa dos afídeos, ou se promovem um tipo de proteção do capsídeo proteico do vírus, facilitando o movimento da partícula viral até as glândulas salivares acessórias. Para ser transmitido, durante o processo de salivação do afídeo, o vírus terá que ultrapassar mais duas barreiras nas glândulas salivares. Na membrana celular (primeira barreira) as partículas irão sofrer, novamente, endocitose. As vesículas contendo as partículas individuais irão se fundir formando os endossomas tubulares. As vesículas tubulares, quando amadurecem, irão se dividir em vesículas simples, que irão se fundir no canal de micro vasos liberando, finalmente, as partículas virais no interior das glândulas salivares (Figura 14B) (VAN DEN HEUVEL et al., 1997).

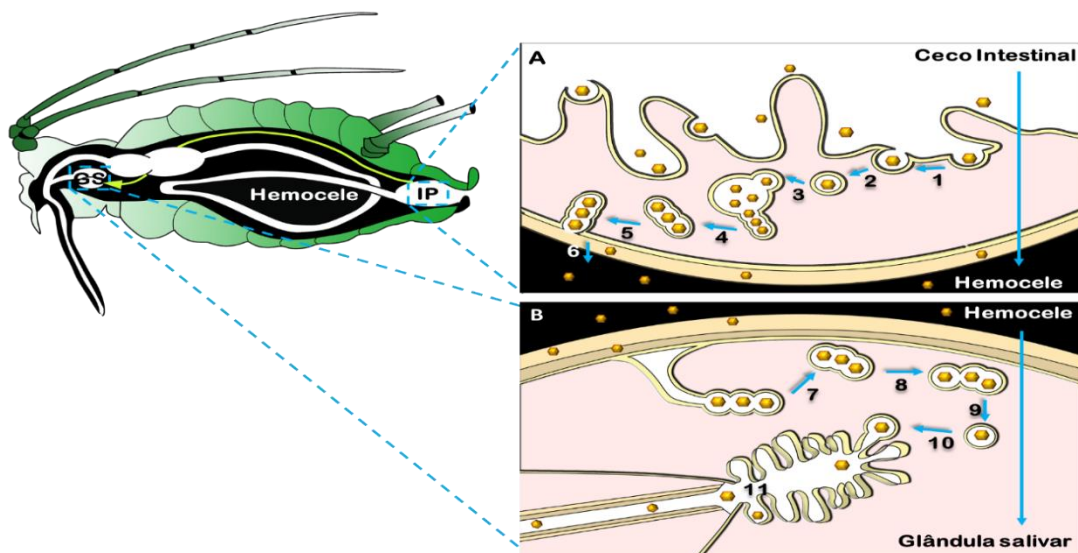


Figura 14 - Modo de transmissão persistente circulativo, não propagativo, típico do turnip yellows virus (TuYV). (A) Passagem do vírus do seco intestinal para a hemocele do inseto vetor, onde vai ocorrer: (1) endocitose da partícula viral; (2) formação das vesículas contendo partícula do vírus; (3) fusão das vesículas ao endossoma; (4) rearranjo das partículas em vesículas tubulares; (5) fusão das vesículas tubulares na membrana basal; (6) liberação das partículas na hemocele. (B) Passagem das partículas virais da hemocele para as glândulas salivares acessórias, onde ocorrerá: (7) endocitose das partículas virais; (8) formação dos endossomas tubulares; (9) divisão dos endossomas tubulares em vesículas simples; (10) fusão das vesículas no canal de microvasos; (11) liberação das partículas no interior das glândulas salivares. Intestino posterior (IP), glândula salivar (GS), ● = partícula viral. (FONTE: O autor)

A maioria dos vírus é transmitida de maneira não circulativa, que é, por sua vez, subdividida em **semipersistente** e **não persistente** (BLANC, UZEST & DRUCKER, 2011; BRAGARD et al., 2013). Na transmissão **semipersistente**, o vírus é retido no cibário (Figura 11 e Figura 13). As principais características desse modo de transmissão são: (i) rápida aquisição do vírus pelo afídeo (minutos); (ii) retenção do vírus pelo vetor (dias); e (iii) inoculação do vírus (minutos/horas) (UZEST et al., 2007; BRAGARD et al., 2013). O cauliflower mosaic virus (CaMV, pertencente ao gênero *Caulimovirus*, família *Caulimoviridae*) é um exemplo de vírus transmitido de modo semipersistente. As partículas do CaMV se ligam especificamente à parede do cibário e/ou estilete do afídeo, utilizando uma estratégia que envolve componentes auxiliares. A interação ocorre por meio do recrutamento de três proteínas virais (P2, P3 e CP): P2, proteína não estrutural que interage com a cutícula do cibário (e/ou estilete); P3, proteína não estrutural, que interage formando uma ponte com as proteínas P2 e CP (capa proteica do vírus) (Figura 13). Apesar das partículas do CaMV serem adquiridas preferencialmente nas células do floema durante o processo de alimentação, o afídeo também pode adquiri-las nas picadas de prova em células do mesofilo, porém, com baixa eficiência (PALACIOS et al., 2002; WHITFIELD, BRYCE & ROTENBERG, 2015). Isso ocorre porque as feridas causadas naquelas células. Durante as picadas de prova, desencadeiam um mecanismo de rápida redistribuição da proteína P2 (*TBS-sense*) para as células próximas às picadas dos afídeos (MARTINIERE et al., 2013). Apesar do modo de transmissão desse vírus ser classificado como semipersistente, alguns trabalhos recentes demonstraram que o CaMV também pode ser detectado na ponta do estilete do afídeo, que corresponde ao local característico dos vírus transmitidos de modo não persistente, o que levou a se classificar, recentemente, o modo de transmissão desse vírus como bimodal (UZEST et al., 2007; MORENO et al., 2011; BAK et al., 2013).

O modo de transmissão **não persistente** tem como características períodos curtos de aquisição (segundos/minutos), retenção (minutos) e inoculação (segundos/minutos), uma vez que as partículas virais ficam restritas à ponta do estilete (PIRONE & BLANC, 1996). Na transmissão não persistente, os vírus são adquiridos e transmitidos durante as picadas de prova, sendo os afídeos os únicos¹ capazes de realizar esse tipo de transmissão. Nesse caso, o inseto não precisa colonizar a planta hospedeira, sendo capaz de transmitir o vírus logo após sua aquisição (HULL, 2014). Nesse modo de transmissão o vírus pode utilizar duas estratégias

¹ Marubayashi et al. (2010) descreveram *Bemisia tabaci* biótipo B transmitindo de modo não persistente o cowpea mild mottle virus (CpMMV – pertencente ao gênero *Carlavirus*), conhecido por induzir a doença denominada de necrose da haste da soja.

de interação vírus/vetor: capsidial e componente auxiliar (BRAULT et al., 2010). O cole latent virus (CoLV, pertencente ao gênero *Carlavirus*, família *Betaflexiviridae*), por exemplo, utiliza a estratégia capsidial, ou seja, a própria proteína da capa (CP) interage diretamente com os receptores de membrana presentes na cutícula do canal estiletar do afídeo (Figura 13) (BRAULT et al., 2010).

A estratégia que utiliza o componente auxiliar é assim denominada, pois a proteína da capa do vírus não interage diretamente com os receptores de membrana do canal estiletar, havendo a participação de uma ou mais proteínas virais que fazem uma “ponte” entre a partícula viral e os receptores de membrana do estilete do afídeo. Como exemplo, pode-se citar o TuMV, que utiliza a proteína não estrutural HC-Pro para fazer a ponte de ligação vírus-vetor (Figura 13 e Figura 15). A HC-Pro é uma proteína multifuncional que, além de estar envolvida na transmissão, participa de diferentes fases da replicação viral (RACCAH et al., 2001; BLANC, UZEST & DRUCKER, 2011). A interação entre canal estiletar/HC-Pro/vírion é realizada por domínios funcionais, sendo dois deles pertencentes ao componente auxiliar. A interação da HC-Pro com a cutícula do canal estiletar ocorre devido ao domínio KITC localizado na porção N-terminal da proteína. Já na porção C-terminal está localizado o domínio PTK, que irá interagir com o domínio DAG localizado na porção C-terminal da capa proteica do vírus (figura 15) (RACCAH et al., 2001; BRAULT et al., 2010). Devido à especificidade entre esses domínios, qualquer alteração nos aminoácidos que os compõem pode acarretar na perda de transmissibilidade do vírus (COSTA, 1998, SAKO, 1980).

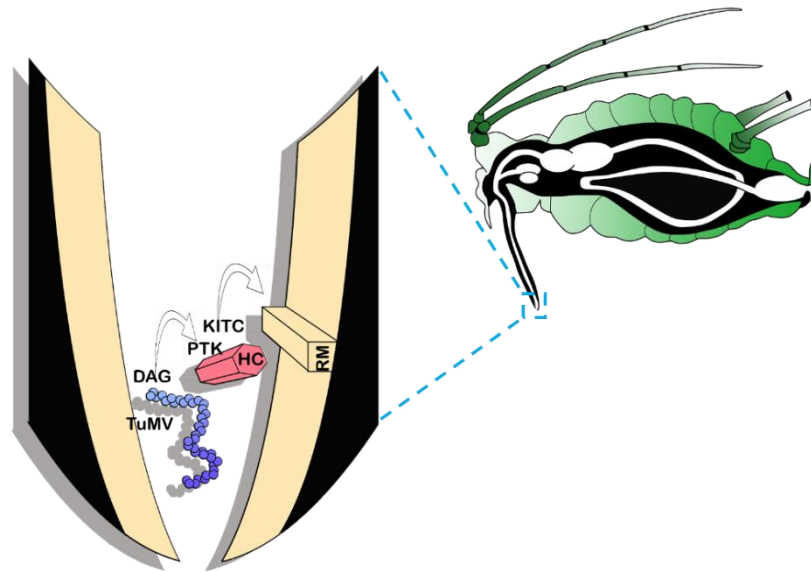


Figura 15 - Detalhe esquemático do corte longitudinal da ponta dos estiletos de um afídeo e os domínios (aminoácidos) funcionais necessários para que haja interação do turnip mosaic virus (TuMV) ao estilete do afídeo vetor (estratégia de transmissão que utiliza um componente auxiliar). O reconhecimento e ligação ocorre entre o receptor de membrana (RM) da cutícula estiletar do afídeo ao domínio KITC presente na proteína viral, não estrutural, HC (*helper component*). Outro domínio, PTK, também presente em HC, por sua vez, se liga ao domínio DAG presente na porção N terminal da capa proteica do TuMV. HC funciona como uma “ponte” de ligação entre a partícula viral e o RM do estilete do afídeo. (FONTE: O Autor)

Recentemente, Webster et al. (2018) identificaram duas proteínas que podem estar relacionadas com a adesão da proteína P2 do CaMV ao canal estiletar dos afídeos *Myzus persicae* e *Acyrtosiphon pisum*. Essas proteínas foram denominadas de *Stylin-01* e *Stylin-02* e pertencem à subfamília RR, inserida dentro da maior família de proteínas cuticulares de artrópodes, denominada de CPR [*Cuticular Proteins with the Rebers and Riddiford consensus sequence* (RR)]. Apesar de terem sido detectadas duas possíveis proteínas estiletares, quando foram realizados estudos de silenciamento gênico, observou-se que a eficiência de transmissão de CaMV por *M. persicae* diminuiu somente quando o gene *Stylin-01* foi silenciado. O mesmo não ocorreu com o gene *Stylin-02*. Portanto, *Stylin-01* foi considerada a melhor candidata relacionada com a transmissão de vírus de maneira não circulativa.

2.4 REPLICAÇÃO DO TuMV NA CÉLULA VEGETAL

Há mais de 1000 espécies de vírus de plantas, distribuídas em 70 gêneros, sendo que aqueles com genoma constituído de RNA fita simples positivo [(+)ssRNA] correspondem ao grupo mais numeroso, com espécies distribuídas em 60 gêneros (HULL, 2014). Apesar de ainda não se conhecer em detalhes os aspectos associados à replicação da grande maioria desses vírus, acredita-se que, muito provavelmente, aqueles constituídos de (+)ssRNA seguem mecanismos básicos de replicação/tradução similares aos mRNAs da célula hospedeira que incluem: (i) tradução da replicase/polimerase viral, que no caso dos potyvírus é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) correspondente a N1b; (ii) síntese dos (-)ssRNA, utilizando as moléculas de (+)ssRNA como molde, mediada pela RdRp viral; e (iii) síntese das moléculas de (+)ssRNA, utilizando as moléculas de (-)ssRNA como moldes, também mediada pela RdRp viral. Nesses processos, há a formação dos duplex de RNA, ou RNAs de dupla fita (dsRNAs) intermediários da replicação (Figura 16) (REVERS & GARCIA, 2015).

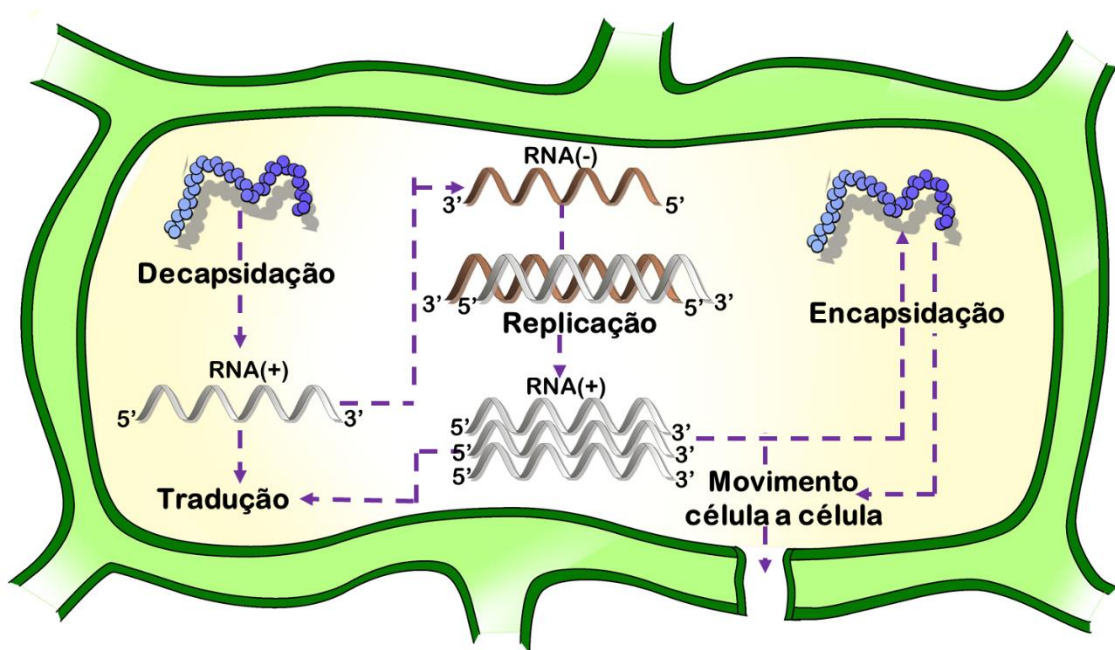


Figura 16 - Representação esquemática simplificada da replicação dos vírus de RNA de fita simples de senso positivo no citoplasma de uma célula vegetal (veja o texto para maiores detalhes). (FONTE: O autor)

Assim que entram na célula hospedeira, os vírus constituídos de (+)ssRNA, estão aptos para a tradução de suas proteínas após o processo de decapsidação (perda da capa

proteica). No caso dos potyvírus, o RNA viral é, inicialmente, traduzido em uma poliproteína, que sofre processamento pós-traducional, sendo clivada por três proteases virais (P1, HC-Pro e NIa-Pro), originando as proteínas virais funcionais (Figura 17) (RAJAMAKI et al., 2005; REVERS & GARCIA, 2015). A protease NIa é do tipo cisteína e atua em *cis* e em *trans*, com sítios de clivagem conservados (Glu-X-X-Tyr-X-Gln/Ser, Gly, Ala, Val) em que as posições “X” são ocupadas por aminoácidos neutros ou hidrofóbicos, promovendo a clivagem da maioria das proteínas virais (CARRINGTON & DOUGHERTY, 1988; DOUGHERTY & PARKS, 1991). A protease P1 é do tipo serina e atua em *cis*, promovendo a clivagem entre as proteínas P1 e HC-Pro, com sítios de clivagem também conservados (Gli-X-Ser-Gli). Já a protease HC-Pro atua em *cis* e é dependente de cisteína, promovendo a clivagem entre as proteínas HC-Pro e P3 (Figura 17) (DOUGHERTY & PARKS, 1991).

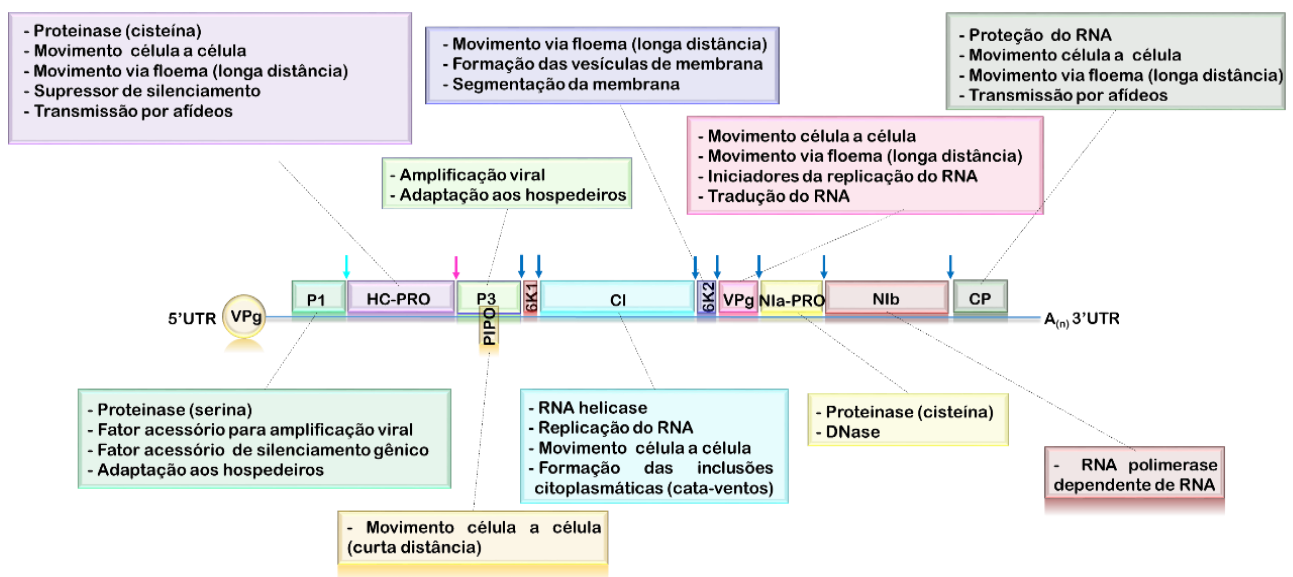


Figura 17 - Principais funções das onze proteínas sintetizadas pelo turnip mosaic virus (TuMV). Estão indicadas em setas coloridas as proteases que clivam a poliproteína dando origem às proteínas virais: protease P1 (seta azul clara); protease HC-Pro (seta rosa) e protease NIa (seta azul escura). (FONTE: O autor)

A expressão das proteínas dos potyvírus ocorre de maneira equimolar, ou seja, todas são sintetizadas em quantidades similares, independentemente da necessidade do vírus em utilizá-las durante o processo infeccioso. Isso leva a um acúmulo de algumas dessas proteínas nas células infectadas, com a consequente formação de inclusões como, por exemplo, as resultantes do acúmulo da proteína CI, associada à formação de inclusões citoplasmáticas cilíndricas, tubulares e os “cata-ventos” (LÓPEZ-MOYA & GARCIA, 2008). Já as proteínas

NIa e NIb, devido ao sinal de localização nuclear presente em suas sequências, acumulam-se nos núcleos das células infectadas, formando inclusões nucleares (RESTREPO, FREED & CARRINGTON, 1990).

A estratégia de tradução utilizada pelos potyvírus ainda tem uma série de pontos a ser desvendada. No entanto, sabe-se que difere, em parte, do mecanismo de tradução dos eucariontes, uma vez que os potyvírus não possuem na porção terminal 5' do seu genoma, a estrutura do tipo *cap* (m^7GpppN), que promove o acoplamento dos fatores de iniciação da tradução de eucariontes (*Eukaryotic Translation Initiation*, eIF3, eIF4A, eIF4E, eIF4G, eIFiso4E, etc.). A molécula de mRNA sofre uma dobra para formar um “loop” a partir de uma interação indireta, levando à uma aproximação entre a estrutura 5'-*cap* e a porção 3' terminal poliadenilada, mediada por uma proteína de ligação à cauda de poli-A [*Poly(A)-Binding Protein*, PABP]. Vale lembrar que essas interações moleculares, que visam, entre outras funções, a estabilizar o mRNA, ocorrem no citoplasma em presença das subunidades ribossomais 40S e 60S, que respondem pela coordenação da tradução das proteínas nas células vegetais (GALLIE, 1998).

Em função de não possuírem a estrutura *cap* em seu terminal 5', a tradução das proteínas dos potyvírus deve ocorrer independentemente de sua presença (CARRINGTON & FREED, 1990). Dessa forma, há duas hipóteses. Na primeira delas, acredita-se que a proteína VPg, ligada covalentemente ao terminal 5' do genoma do vírus, desempenha o papel do *cap*, possibilitando a circularização do (+)ssRNA viral durante a tradução, de modo similar ao que ocorre com os mRNA dos eucariontes, sendo esse modelo denominado *loop model* (BI & GOSS, 2000). A VPg, portanto, recruta os fatores eIF4E ou eIF(iso)4E e eIF4G ou eIF(iso)4G, sendo este último responsável pela maior interação entre os fatores eIF(iso)4E e a proteína VPg (NICAISE et al., 2003). No caso específico do TuMV, demonstrou-se que a PABP aumenta a eficiência de ligação da VPg a eIFiso4E, promovendo a estabilização dos complexos de iniciação da tradução (Figura 18) (KHAN & GOSS, 2012). Wittmann et al. (1997), utilizando um sistema de duplo-híbrido em leveduras, demonstraram que a proteína VPg do TuMV interage com eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* e de aveia (*Avena sativa*). A segunda hipótese envolve a via de tradução independente de *cap*, em que o recrutamento da subunidade ribossomal 40S é realizada por sítios internos de entrada dos ribossomos (*Internal Ribosome Entry Sites*, IRES) localizados na porção UTR do terminal 5' do RNA viral, não sendo necessário o fator de iniciação da tradução de eucariontes (eIF) (PELLETIER & SONENBERG, 1988).

Após a tradução e a clivagem da poliproteína, o vírus terá à sua disposição todas as proteínas para o início da replicação e das demais etapas do processo infeccioso. De modo geral, as proteínas virais envolvidas na replicação irão recrutar o RNA viral e associá-lo às proteínas (e outros fatores) celulares, formando o complexo replicativo conhecido também por fábrica de replicação (*replication factories*) (MEDEIROS, 2015; REVERS & GARCIA, 2015). Em geral, os vírus, tanto de animais como de plantas, induzem à formação de vesículas membranosas, que dependendo da família do vírus podem ser de diferentes formatos e derivadas de diferentes organelas celulares como: retículo endoplasmático, mitocôndria, peroxissomos, lisossomos e/ou cloroplastos. Essas vesículas são os locais de formação das fábricas de vírus, que geralmente contêm os RNAs positivos e negativos, a RNA polimerase (RdRp) e fatores do hospedeiro, protegendo o RNA viral da degradação pelos sistemas celulares de defesa (GRANGEON COTTON & LALIBERTÉ, 2010).

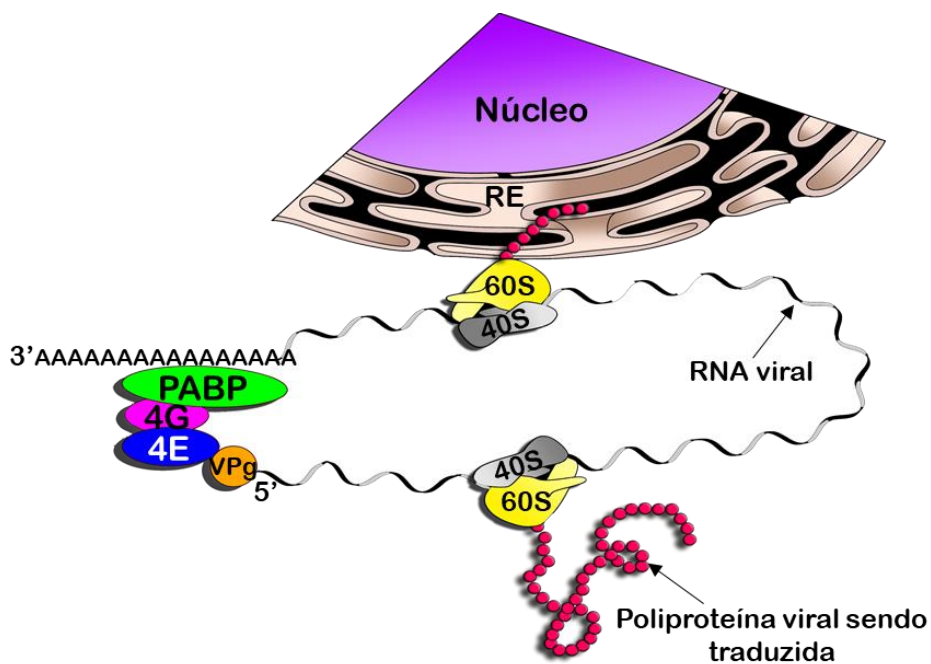


Figura 18 - Esquema simplificado do processo de tradução das proteínas do turnip mosaic virus (TuMV) no citoplasma de uma célula vegetal. A circularização do RNA viral é intermediada por PABP (proteína de ligação à cauda de poli-A) e outros fatores de iniciação da tradução em eucariontes como, por exemplo eIF(iso)4G e eIF(iso)4E, que promovem a aproximação dos terminais 3' e 5' não traduzidos do RNA viral. No esquema, observa-se que a proteína VPg, ligada covalentemente ao terminal 5' do RNA viral, se une ao eIF(iso)4E, que por sua vez se une a eIF(iso)4G, que se liga a PABP, unida à cauda poliadenilada do terminal 3' do RNA viral. A tradução ocorre no citoplasma em associação às subunidades ribossômicas 40S e 60S, sendo as proteínas sintetizadas em associação direta ao retículo endoplasmático rugoso (RE). (FONTE: O autor)

A replicação dos potyvírus, incluindo o TuMV, ocorre no citoplasma das células infectadas. No entanto, as vesículas que irão proteger o RNA viral durante a replicação são derivadas do retículo endoplasmático rugoso (RE) (KOONIN, BOYKO & DOLJA, 1991; SCHAAD, JENSEN & CARRINGTON, 1997). As vesículas são formadas graças ao acúmulo da proteína 6K₂, que possui um domínio hidrofóbico central, possibilitando sua associação com as membranas do RE. Quando em associação com outras duas proteínas virais (VPg-NIaPro) formam a poliproteína 6K₂-VPg-NIaPro, responsável pela formação das vesículas citoplasmáticas distribuídas por toda a zona cortical e perinuclear do RE. No final da replicação, as vesículas são liberadas do RE por meio da autoproteólise entre as proteínas VPg e NIa (Figura 19) (RESTREPO-HARTWIG & CARRINGTON, 1994; REVERS & GARCIA, 2015). Cotton et al. (2009) comprovaram que essas vesículas funcionam como sítios de replicação do TuMV, após utilizarem um vírus recombinante, que expressava uma proteína fluorescente associada a 6K₂ (6K₂-GFP), e anticorpos que reconheciam RNAs de cadeia dupla.

Os mecanismos pelos quais as vesículas se desenvolvem e proliferam estão diretamente relacionados com o acúmulo da proteína 6K₂ nos sítios de exportação do RE (*exit sites* -ERES), e associadas com as vesículas sintetizadas no complexo de Golgi, denominadas COPI e COPII (REVERS & GARCIA, 2015). Estudos indicam que o acúmulo da proteína 6K₂ no retículo endoplasmático depende das vesículas do tipo COPI e COPII, que promovem a biogênese dessas entre os ERES e o complexo de Golgi (WEI & WANG, 2008). A biogênese das vesículas foi demonstrada em um estudo realizado por Cotton et al. (2009), em que os autores inocularam plantas com clones infecciosos do TuMV, os quais expressavam a proteína 6K₂ marcadas com duas proteínas fluorescentes [GFP (*green fluorescent protein*) e mCherry (*red fluorescent protein*)]. Observou-se que ambas as fluorescências (verdes e vermelhas) estavam presentes na célula, no entanto elas apareciam isoladas, sugerindo que cada vesícula havia sido derivada e induzida a partir de um único genoma viral. Algumas vesículas também apresentavam as cores vermelha, verde e amarela, indicando a fusão entre elas durante o tráfego das vesículas no citoplasma (COTTON et al., 2009).

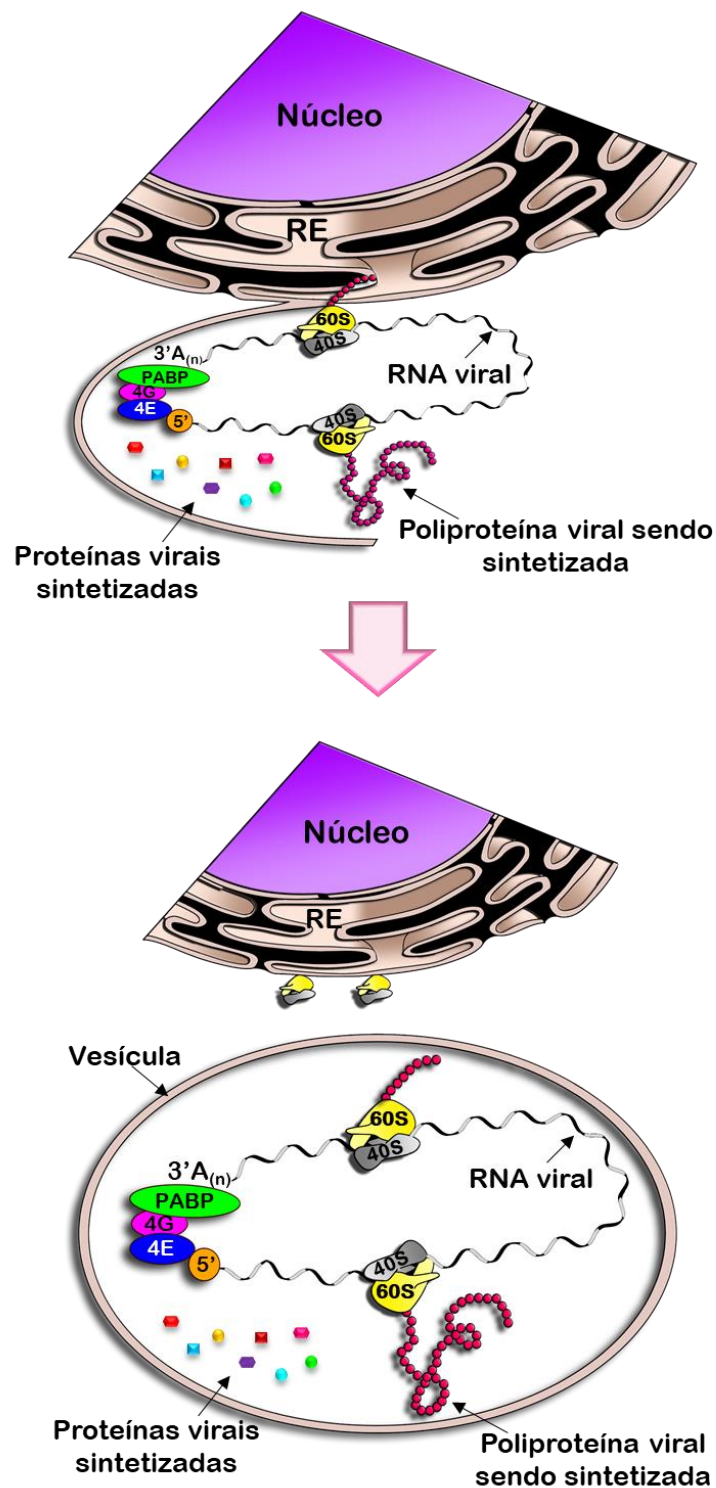


Figura 19 - Esquema da tradução das proteínas do turnip mosaic virus (TuMV) e formação das vesículas, que correspondem ao sítio de replicação do RNA viral. Após alguns ciclos de tradução, as proteínas 6K₂, VPg e NIaPro estarão em quantidades suficientes para o início da indução para a formação das vesículas. A proteína 6K₂ acumula-se nos sítios de exportação do retículo endoplasmático rugoso (ERES), induzido a formação das vesículas replicativas. Nas vesículas ocorre o recrutamento dos fatores eucariontes envolvidos na tradução assim como na replicação do RNA viral e das proteínas virais sintetizadas. O acúmulo das proteínas em seu interior promove um aumento no tamanho da vesícula. (FONTE: O autor)

Wei et al. (2010) demonstraram que as vesículas induzidas somente pela proteína 6K₂ ou por infecção do TuMV se ligavam ao cloroplasto e induziam invaginações de membrana. Sendo assim, apesar dos potyvírus iniciarem a sua tradução e a formação das vesículas replicativas no RE em associação com 6K₂ + COPI e COPII, é na periferia dos cloroplastos que são formadas as fábricas de vírus do TuMV. Os mesmos autores, utilizando clones infecciosos de TuMV marcados com GFP que expressavam a proteína 6K₂, demonstraram que após a maturação as vesículas replicativas migram e se acumulam na periferia dos cloroplastos formando estruturas tubulares e alongadas. Essas estruturas promovem a aglomeração dos cloroplastos adjacentes, fornecendo aos potyvírus em fase replicativa, um ambiente com alta concentração de energia, além de protegê-los de maneira eficaz contra as respostas de defesa da planta. A migração dessas vesículas até a periferia dos cloroplastos é intermediada pelas vesículas do tipo COPI e COPII em associação com o citoesqueleto (actina e miosina), enquanto que a fusão das vesículas no cloroplasto é intermediada pelo fator Syp71² da hospedeira (Figura 20) (WEI et al., 2010).

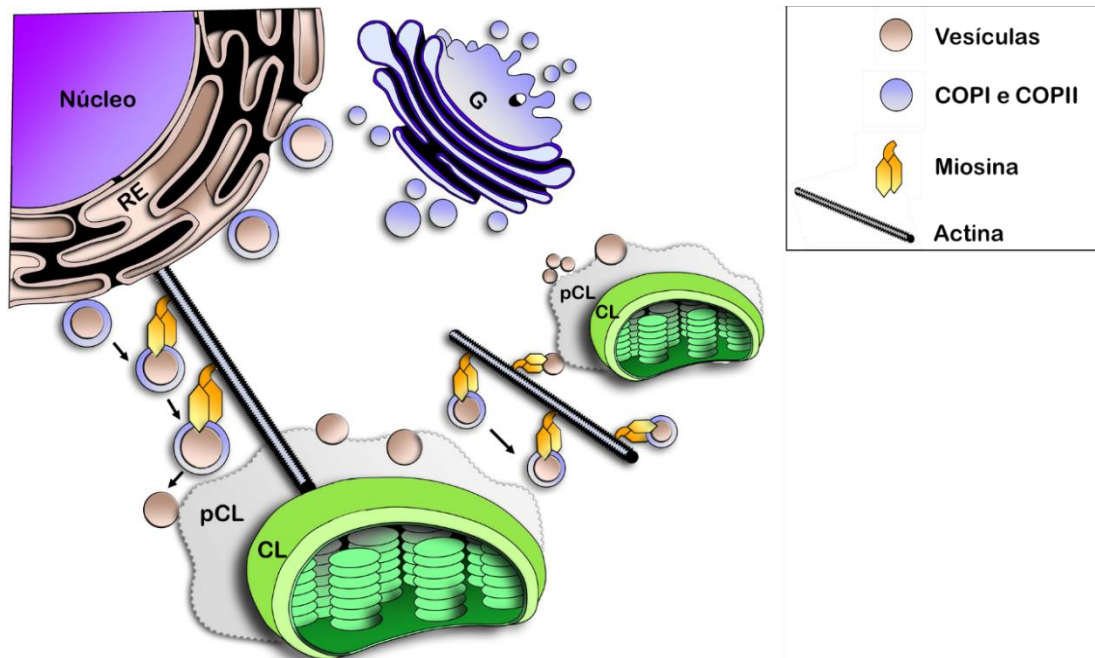


Figura 20 - Após a maturação, as vesículas migram para a periferia dos cloroplastos (pCL), local definido como o sítio de replicação do turnip mosaic virus (TuMV). A migração irá depender da associação das vesículas do tipo COPI e COPII derivadas do complexo de Golgi (G) que irá interagir com o citoesqueleto (miosina e actina) da célula vegetal carregando as vesículas do complexo replicativo (6K₂) até a pCL. (FONTE: O autor)

² Syp71 é uma das proteínas sintetizadas pelo fator SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors*) que desempenha um papel fundamental na fusão das membranas do sistema de transporte dos eucariontes. Em *Arabidopsis thaliana* já foram descritas 64 proteínas codificadas por alelos do gene que codifica SNARE, no entanto, acredita-se que esse número pode ser ainda maior em outros eucariontes.

A maioria das proteínas sintetizadas pelos potyvírus está relacionada com a fase replicativa e é recrutada pelos complexos replicativos (VCRs), sendo elas: (i) a região **3'-UTR** do RNA viral (cauda poli-A), que apesar de não codificar uma proteína viral, atua como promotora para a síntese dos RNA negativos. No entanto, quando associada à proteína da capa (**CP**) formam estruturas secundárias que serão reconhecidas pelos VCRs; (ii) **P1** apesar de não estar diretamente envolvida na amplificação do genoma viral, atua como fator acessório de amplificação e pode estar envolvida com o acúmulo e infectividade do vírus nas células; (iii) **P3** é uma das proteínas de membrana que auxiliam na formação dos VCRs do TuMV, além de estar associada com as proteínas **CI**, **NIb** e **NIa** nos VCRs ou fatores do hospedeiros; (iv) **VPg** atua como iniciadora da síntese dos RNAs de polaridade negativa; (v) **CI** atua como RNA helicase e ATPase, além de estar relacionada com a formação do núcleo replicativo em associação com as proteínas **NIa** e **NIb**; (vi) **6K2**, devido ao um domínio central hidrofóbico composto por 19 aminoácidos, essa proteína possui característica de associação à membrana agindo como âncora nas membranas do retículo endoplasmático. Porém, como o sítio de clivagem entre as proteínas **6K2** e **NIa** possui baixa afinidade pela protease, essas permanecem como um polipeptídeo durante um tempo mais longo, enquanto que a **NIb** é recrutada para o retículo endoplasmático por meio da **NIa**, devido a interações proteína-proteína; (vii) **NIb** (RdRp) é a enzima responsável pela síntese das fitas de RNA positivas e/ou negativas (MURPHY et al., 1996; TACAHASHI & UYEDA, 1999; REVERS & GARCIA, 2015; CUI et al., 2017, GRANGEON et al., 2013).

Para que o TuMV tenha sucesso na infecção e posterior disseminação para outras plantas, é necessário que ele consiga infectar sistemicamente a sua hospedeira, via floema (movimento a longas distâncias). No entanto, para que isso ocorra, primeiramente, o vírus terá que infectar as células adjacentes aos sítios iniciais de infecção dos tecidos foliares (movimento célula a célula ou a curtas distâncias) até chegar ao floema. A infecção das células vizinhas é realizada através dos canais de ligação dos citoplasmas e do sistema de endomembrana celulares, denominados de plasmodesmos. Agbeci et al. (2013) estimaram que a taxa de infecção a curtas distâncias do TuMV, em *Nicotiana benthamiana*, é de uma nova célula a cada 3 horas.

Porém, os plasmodesmos apresentam um limite de exclusão passivo restrito, que varia de 30 a 80 nm dependendo do tipo de célula, sendo necessário que uma ou mais proteínas virais promovam a dilatação desses canais, possibilitando a passagem dos vírus para as células vizinhas (REVERS & GARCIA, 2015). Apesar do movimento célula a célula dos potyvírus ainda não estar totalmente elucidado, o seu mecanismo de ação difere da maioria dos vírus, uma

vez que os potyvirus não possuem uma única proteína associada ao movimento. Até o momento, foram descritas quatro proteínas virais multifuncionais diretamente envolvidas no movimento célula a célula: inclusão cilíndrica (CI), capa proteica (CP), *helper component* (HC-Pro), e mais recentemente, a P3N-PIPO. Apesar dos mecanismos de ação da P3N-PIPO ainda não estarem totalmente definidos, estudos demonstraram que esta proteína está diretamente relacionada com o aumento do limite de exclusão dos plasmodesmos e é atualmente considerada a proteína que mais se assemelha com uma típica proteína de movimento (CUI et al., 2017; OTULAK & GARBACZEWSKA, 2011).

Em geral, a interação da proteína P3N-PIPO com os canais dos plasmodesmos depende mais do sistema de transporte ER-Golgi (COPI e COPPII) do que do sistema de transporte actina-miosina. Além disso, assim como as demais proteínas envolvidas no movimento a curtas distâncias dos potyvirus, P3N-PIPO não é uma proteína de transmembrana ou uma âncora de membrana. Dessa forma, a interação de P3N-PIPO com os plasmodesmos será dependente de outras associações a fatores do hospedeiro. No caso do TuMV, a proteína de ligação de cátions (PCaP1) media o direcionamento da P3N-PIPO para os plasmodesmos (VIJAYAPALANI et al., 2012). O direcionamento da CI para os plasmodesmos é intermediado, em dose dependente, por P3N-PIPO. Ou seja, o direcionamento da CI pela proteína P3N-PIPO é mais eficiente quando as concentrações das duas proteínas são equivalentes (1:1), sendo que o transporte fica menos eficiente conforme a concentração de CI aumenta (10:1) (Figura 21) (WEI et al., 2010).

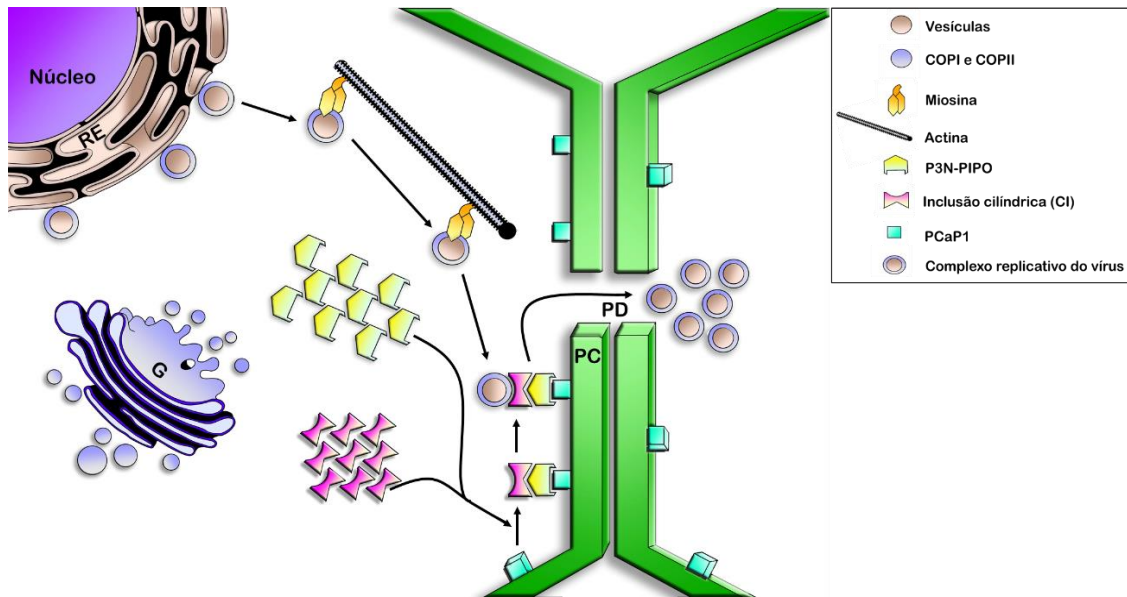


Figura 21 - Movimento a curtas distâncias (célula a célula) típico dos potyvírus, no qual as proteínas virais P3N-PIPO e CI interagem com uma proteína de membrana do hospedeiro (PCaP1), aumentando o limite de exclusão dos pasmodemos (PD), possibilitando a passagem do complexo replicativo do vírus (6K₂) para as células vizinhas. (G) – Complexo de Golgi, (RE) retículo endoplasmático e (PC) parede celular. (FONTE: O autor)

A CP também interage com as proteínas P3N-PIPO-CI no movimento célula a célula. A CP dos potyvírus tem três domínios variáveis nas regiões N- e C-terminal e um domínio central que interage com o RNA viral (WEI et al., 2010). Dolja et al. (1994; 1995) ao produzirem mutações na região do domínio central da CP de um isolado de tobacco etch virus (TEV, gênero *Potyvirus*), demonstraram que esse vírus apresentava deficiência tanto no movimento célula a célula como também na encapsidação do genoma viral. Nesses mesmos estudos, foi possível demonstrar que a região N-terminal da CP também tem papel acessório no movimento a curtas distâncias, uma vez que mutações nessa região também interferiram no movimento célula a célula. Apesar da proteína HC-Pro também já ter sido descrita como uma das proteínas que intermediam o movimento célula a célula dos potyvírus aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmos, ainda pouco se sabe sobre a sua interação com as demais proteínas e seu modo de ação.

Após a infecção das primeiras células, o vírus terá que ultrapassar outras barreiras até atingir os vasos condutores, para que seja distribuído para as demais partes da planta hospedeira. Essas barreiras poderão agir como *bottlenecks* (gargalos de garrafa), selecionando as populações de vírus presentes no hospedeiro (HIPPER et al., 2013). Alguns estudos sugerem que o sucesso na infecção das células do floema dependerá diretamente da concentração do vírus na seiva e/ou da capacidade de transpor as barreiras impostas pelo

hospedeiro (GUTIERREZ, MICHALAKIS & BLANK, 2012). Wan et al. (2015) demonstraram que o TuMV pode se mover sistemicamente, tanto pelos vasos condutores do xilema quanto do floema, em *Nicotiana benthamiana*. Nesse mesmo estudo, os autores observaram os complexos replicativos (formados pela proteína 6K₂) em todos os tecidos da hospedeira, o que sugere que estejam envolvidos no movimento do TuMV a longas distâncias. No entanto, as estratégias utilizadas pelos potyvírus para infectar sistemicamente suas hospedeiras ainda são pouco conhecidas (REVERS & GARCIA, 2015). Porém, já foram descritas algumas proteínas virais envolvidas e alguns fatores do hospedeiro que podem estar relacionados com o movimento a longas distâncias.

As proteínas virais, até o momento descritas, envolvidas no movimento a longas distâncias (via floema) são três: capa proteica (CP), *helper component* (HC-Pro) e *viral genome-linked* (VPg). No entanto, a proteína 6K₂ do potato virus A (PVA, *Potyvirus*), também está relacionada com o movimento a longas distâncias, uma vez que, em *Nicandra physalodes*, a 6K₂ supera a resistência que restringe o movimento do vírus, sendo considerada um fator de virulência (RAJAMÄI & VALKONEN, 1999). Schaad, Lellis e Carrington (1997) demonstraram que uma única alteração de aminoácidos na região N terminal da proteína 6K₂ foi suficiente para restabelecer o movimento do vírus a longas distâncias. Porém, ainda não se sabe se essa proteína também está relacionada com o movimento a longas distâncias de outros potyvírus (HIPPER et al., 2013).

Durante a década de 1990, diversos trabalhos foram realizados para comprovar que as regiões N e C terminal da CP eram essenciais para o movimento a longas distâncias dos potyvírus, e mais recentemente, essas duas regiões foram consideradas determinantes para o sucesso do movimento via floema para os membros da família *Potyviridae* (TATINENI & FRENCH, 2014; REVERS & GARCIA, 2015; TATINENI, VAN WINKLE & FRENCH, 2011). A região N terminal da CP não desempenha somente um papel fundamental e direto no movimento do vírus a longas distâncias, mas essa região também está associada a mecanismos de resistência específicos do hospedeiro, confinando os vírus nas folhas inoculadas (CARBONELL et al., 2013; DECROOCQ et al., 2009).

A VPg também está associada com o movimento a longas distâncias dos potyvírus e há hipóteses de que essa proteína atua superando a resistência imposta pelo hospedeiro no movimento do vírus a longas distâncias (PUUSTINEN et al., 2002). Estudos realizados por Schaad, Lellis e Carrington (1997), utilizando TEV, demonstraram que mutações na VPg superaram a resistência do hospedeiro facilitando o movimento do vírus via floema. Embora a resistência do movimento do vírus a longas distâncias seja específica da hospedeira,

estudos realizados com o PVA demonstraram que a mudança de um único aminoácido no domínio central da VPg restaurou o movimento do vírus em *N. physalodes* (RAJAMÄI & VALKONEN, 1999).

Estudos com TEV revelaram que a parte central da proteína HC-Pro está relacionada com o movimento a longas distâncias. No entanto, a ação dessa proteína no movimento está correlacionada com a ação de supressão do silenciamento gênico (KASSCHAU & CARRINGTON, 2001). Mutantes de TuMV para HC-Pro foram incapazes de se mover sistemicamente em plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana*, sendo restaurado o movimento via floema somente quando o RDR1 (*RNA-dependent RNA polymerase*) e RDR2 da hospedeira foram silenciados (GARCIA-RUIZ et al., 2010). Nesse estudo, ficou comprovado que HC-Pro dá suporte ao movimento a longas distâncias por meio da supressão da atividade de dependente da síntese de siRNA.

2.5 ASPECTOS RELACIONADOS AO CONTROLE E IMUNIDADE INATA EM PLANTAS

As epidemias de vírus de plantas no ambiente selvagem são raras devido à elevada diversidade genética inter e intraespecífica e à distribuição espacial das plantas, levando muitas vezes ao isolamento entre membros de uma mesma espécie. Além disso, muitos indivíduos não são hospedeiros dos vírus e/ou dos vetores em função da presença de diferentes genes de resistência espalhados pela população. Esses fatores, aliados ao controle natural dos vetores por meio de predadores e/ou parasitas, fazem com que a fonte de inóculo do patógeno e a taxa de dispersão da(s) doença(s) sejam reduzidas, sendo mantido um equilíbrio das populações de patógenos (vírus), vetores e hospedeiros (JONES, 2006). Em contraponto, a domesticação das espécies de plantas aliada às práticas agrícolas, principalmente com as monoculturas mantidas durante longos períodos em uma mesma área, proporciona condições adequadas para o estabelecimento das epidemias. Além disso, o intercâmbio das plantas cultivadas permitiu a dispersão das viroses e dos vetores para as mais diferentes regiões do mundo. O intercâmbio de espécies vegetais também submete as espécies introduzidas a uma situação de “novo encontro” à medida que tiverem contato com os vírus nativos pré-estabelecidos, facilitando o surgimento de novas doenças e epidemias (BOS, 1992).

As plantas possuem um sistema de defesa inato e complexo, que é ativado no momento e local apropriados (CAMARGO et al., 2018). A resposta é iniciada com o reconhecimento de sinais exógenos do patógeno, os quais, ao serem identificados pelo sistema

de defesa da planta, resultarão em uma reprogramação do metabolismo celular (WALTERS, NEWTON & LYON, 2007). Os sinais de reconhecimento de um microrganismo (proteínas, partes deles ou até mesmo do microrganismo ou patógeno como um todo) não patogênico ou patogênico, pelo hospedeiro são denominados “padrões moleculares associados a microrganismos não patogênicos” (MAMPs) e “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMPs), respectivamente. Esses mecanismos são desencadeados por meio de “receptores de reconhecimentos de padrões moleculares” (PRRs) localizados na membrana plasmática ou no interior das células (MANDADI & SCHOLTHOF, 2013; EIRAS, DIANESE & CARVALHO-PEREIRA, 2018). Quando há o reconhecimento das estruturas do patógeno pelos PRRs, uma série de sinais se desencadeia, produzindo uma resposta rápida e forte denominada “imunidade disparada por PAMP” (*PAMP triggered immunity*, PTI) (JONES & DANGL, 2006; MANDADI & SCHOLTHOF, 2013).

Porém, para se estabelecer e obter sucesso na infecção, os patógenos devem contra-atacar para ultrapassar a segunda linha de defesa da planta denominada de “imunidade desencadeada por efetores” (*effector-triggered immunity*, ETI), codificando elicitores ou proteínas efetoras, que irão interferir no reconhecimento pelos PRR por meio de “efetores que desencadeiam suscetibilidade” (*effector triggered susceptibility*, ETS). Esses efetores são moléculas associadas a um patógeno, que alteram as respostas de defesa do seu hospedeiro. No processo ETI, o hospedeiro se defende dos ETS. Esses mecanismos de reconhecimento patógeno-hospedeiro (ataque/defesa/contra-ataque/defesa) seguem um modelo denominado zig-zag (JONES & DANGL, 2006). Os mecanismos de imunidade inata (PTI-ETI) ainda são complementados por mecanismos de defesa da planta baseados em silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Dessa forma, as plantas se defendem, tanto contra proteínas (efetores) quanto contra os ácidos nucleicos (dsRNA) virais (NICAISE, 2017; EIRAS, DIANESE & CARVALHO-PEREIRA, 2018).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a penetração e subsequente infecção (colonização) do patógeno podem ser pré-formados (constitutivos³) e/ou pós-formados (induzidos⁴), estruturais ou bioquímicos. Os mecanismos estruturais atuam como barreiras contra a penetração e/ou colonização do patógeno. Já os bioquímicos referem-se à presença de determinadas substâncias que inibem o desenvolvimento ou geram condições adversas à sobrevivência do patógeno (BARROS et al., 2010). As plantas apresentam redes complexas

³Constitutivos - referem-se às estruturas presentes na planta independentes do contato com o patógeno; além da proteção, as estruturas podem estar associadas com outras funções.

⁴Induzidos - desencadeados após o contato do patógeno com o hospedeiro (HULL, 2014).

contra o ataque de vírus, que conferem a elas diferentes respostas de resistência, podendo estar associadas com uma reação de hipersensibilidade (HR), que ocorre no local da infecção e pode desencadear uma resistência sistêmica adquirida (SAR) em partes remotas da planta, distantes do local de contato ou do início da infecção pelo patógeno. A reação de hipersensibilidade é acompanhada de necrose nos locais da infecção, impedindo o acesso do patógeno às células vizinhas (PENG et al., 2013). No entanto, ainda não está claro se a morte celular é uma causa direta da resistência do hospedeiro ou resultado de mecanismos de sinalização que levariam a eventos capazes de inibir a ação do patógeno (BARROS et al., 2010). Porém, quando o patógeno consegue ultrapassar as barreiras impostas pelos sistemas de defesa da planta, está se torna hospedeira do patógeno, podendo ser classificada como susceptível⁵ ou resistente⁶. Quando se considera a resposta do hospedeiro ao vírus, esta pode ser classificada como sensível (sintomas severos) ou tolerante (sintomas brandos ou imperceptíveis) (EIRAS, DIANESE & CARVALHO-PEREIRA, 2018).

Diferentes estratégias podem ser empregadas com o intuito de controlar as epidemias. Porém, para se lançar mão de uma medida adequada de manejo e controle de uma doença, é necessário um amplo conhecimento dos componentes do patossistema em estudo. No caso das viroses, diversos fatores que se inter-relacionam devem ser levados em consideração: patógeno (vírus), hospedeiro (planta), vetor (se houver), ambiente e o homem (Figura 22) (EIRAS, DIANESE & CARVALHO-PEREIRA, 2018).

⁵Susceptível - termo utilizado para descrever um hospedeiro no qual o vírus é capaz de infectar, se multiplicar e se movimentar (a curtas e longas distâncias).

⁶Resistente - termo utilizado para descrever um hospedeiro no qual o vírus infecta, mas há restrição na sua multiplicação e movimento (HULL, 2014).

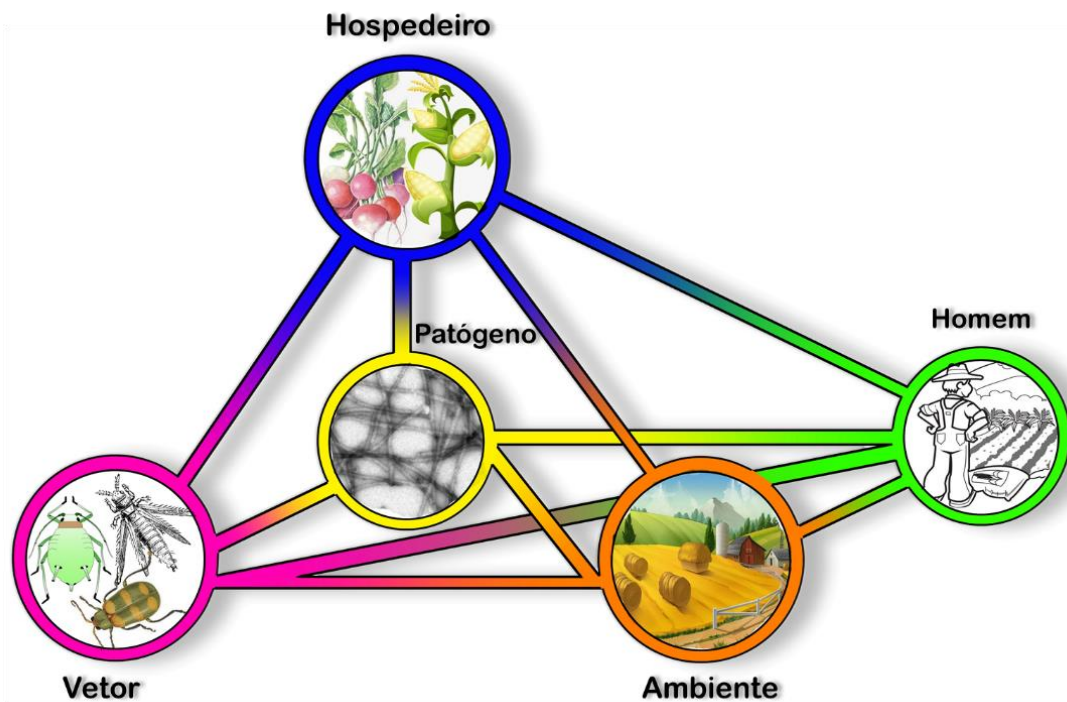


Figura 22 - Esquema envolvendo os componentes associados a uma virose que se inter-relacionam em um agroecossistema. (FONTE: O autor)

Os vírus, por serem parasitas intracelulares obrigatórios e por estabelecerem uma íntima relação com suas hospedeiras, têm os métodos de controle baseados na prevenção (PEREIRA-CARVALHO & COSTA, 2015). Especificamente para o TuMV, são preconizados alguns métodos. O controle cultural envolve a adoção de práticas fitossanitárias dentro e no entorno dos campos de produção, visando à eliminação de plantas infectadas e das possíveis hospedeiras do vírus e/ou dos afídeos vetores. Essa prática também sugere a fuga das épocas de plantio que coincidam com os períodos de maiores revoadas de afídeos (SHATTUCK, 1992).

O controle químico com uso de inseticidas, para insetos vetores de vírus, é controverso. Esse método não é recomendado para vírus transmitidos de modo não persistente como o TuMV, uma vez que a transmissão do vírus ocorre logo após sua aquisição, antes que o inseticida faça efeito sobre o afídeo. Outro ponto a ser considerado é que o uso de determinados inseticidas pode aumentar a taxa de disseminação do vírus, por causar alteração no comportamento do afídeo e/ou por matar insetos predadores (HULL, 2014). No entanto, o controle químico pode ser recomendado, em situações especiais, preventivamente, nas épocas em que as populações de afídeos aumentam consideravelmente (SHATTUK, 1992).

A utilização de óleo mineral também já foi descrita como alternativa de controle de potyvírus, incluindo o TuMV. Walkey e Dance (1979) demonstraram que a pulverização de uma solução de 1% de óleo mineral diminuiu a taxa de transmissão do TuMV por *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae* para mudas de mostarda em casa de vegetação. Lowery, Sear e Harmer. (1990) constataram que a aplicação de cipermetrina com 1% de óleo mineral reduziu a incidência do TuMV em plantas de nabo de 92% para 37%.

Métodos preventivos e terapêuticos também já foram descritos como possibilidades de controle do TuMV. Tamura (1969) observou a supressão da infecção pelo TuMV, pulverizando extrato de folha e casca de *Pinnus thunbergii* em plantas de rabanete e *Chenopodium amaranticolor*. Pulverizações de extratos de *Callistemon lanceolatus* (escova-de-garrafa), *Acacia arabica*, *Syzygium cuminii* (jamelão), logo após a inoculação do TuMV em *C. amaranticolor* e *C. albu*, diminuíram significativamente a quantidade de lesões locais induzidas pelo vírus, sugerindo que esses extratos continham alguma substância que induzia a resistência das plantas ao vírus (PANDEY & MOHAN, 1986).

2.5.1 RESISTÊNCIA GENÉTICA E OS GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO TUMV

Dos métodos disponíveis para controle de vírus, os mais eficazes são aqueles que se baseiam em imunização genética, via melhoramento genético clássico ou através de transgenia. Os genes utilizados como fonte de resistência a vírus podem ser classificados em dominantes (genes *R*) ou recessivos. Porém, aproximadamente 50% dos genes de resistência de plantas a vírus é do tipo dominante (LI et al., 2018).

Os conceitos da teoria gene-a-gene (FLOR, 1971) baseiam-se na interação entre o produto de um gene de resistência (*R*) do hospedeiro e um elicitor (produto de um gene de avirulência, *Avr*) do patógeno. Os genes *R* são, normalmente, ativados em associação ao disparo concomitante da morte celular programada, que leva à indução de uma reação de hipersensibilidade (HR), com sintomas de necrose, ou, em algumas situações, induzindo uma resistência extrema (ER), sem a expressão de qualquer sintoma. Além dessa interação direta, pode haver um reconhecimento indireto dos efetores por proteínas *R* do hospedeiro. Nesse tipo de reconhecimento, denominado Teoria de “Guarda” (DANGL & JONES, 2001), os genes *R* constituem um sistema de alerta, capaz de identificar a presença do efector, sem haver interação física entre os produtos de *R* com o respectivo efector. Alguns fatores de avirulência já foram

identificados nas interações entre vírus e plantas como, por exemplo, a replicase, a proteína de movimento e a proteína do capsídeo (Tabela 2).

Para os genes de resistência recessivos, dois mecanismos de ação foram propostos: (i) passivo, no qual a resistência se expressa pela ausência de um fator do hospedeiro requerido para o vírus completar o ciclo infeccioso; e (ii) ativo, em que há um fator do hospedeiro que, ao identificar fatores virais, dispara as respostas de defesa da planta. Acredita-se que o mecanismo passivo seria mais comum para explicar a resistência recessiva aos potyvírus (DIAZ-PENDÓN et al., 2004; ROBAGLIA & CARANTA, 2006). Os genes recessivos têm sido associados com os fatores de tradução em eucariontes (eIFs), principalmente com as proteínas das famílias eIF4E e eIF4G (EIRAS, DIANESE & CARVALHO-PEREIRA, 2018)

Os genes de resistência para o TuMV têm sido mapeados e descritos em variedades de *Brassica rapa* e *B. napus*. Os dominantes são denominados *TuMV resistance in brassica* (*TuRB*) e, até o presente momento, foram descritos cinco diferentes genes: *TuRB01*, *TuRB01b*, *TuRB03*, *TuRB04* e *TuRB05* (Tabela 2).

O *TuRB01* foi o primeiro gene a ser mapeado em espécies do gênero *Brassica* (WALSH et al, 1999). Esse gene está alocado no cromossomo N6 de *B. napus*, conferindo ER a isolados de TuMV do patotipo 1. Porém, uma simples mutação na porção genômica que codifica a proteína da inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) de um isolado de TuMV, foi capaz de superar essa resistência (WALSH et al., 1999). A linhagem diferenciadora **R4** (proveniente de canola de inverno variedade *Rafal*), possui um gene de dominância ao patotipo 1, que apresenta as mesmas interações e especificidade conferidas pelo *TuRB01* aos isolados de TuMV, apesar desse gene ainda não ter sido identificado, estudos sugerem que possa ser o *TuRB01* (WALSH, 1989; JENNER & WALSH, 1996). Assim como o *TuRB01*, o *TuRB01b* também confere ER aos isolados de TuMV classificados como pertencentes ao patotipo 1, porém esse gene foi mapeado no mesmo intervalo do cromossomo N6 (RUSHOLME, 2000; WALSH & JENNER, 2002).

Tabela 2 - Genes dominantes e recessivos associados à resistência de plantas a potyvírus

Genes de resistência dominantes	Vírus	Espécie de planta	Proteína R	Fator Avr
<i>I</i>	BCMV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	TIR-NB-LRR	ND
<i>RTM1</i>	LMV, PPV, TEV	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tipo Jacalina	Capa proteica
<i>RTM2</i>	LMV, PPV, TEV	<i>A. thaliana</i>	<i>Small Heat-shock</i>	Capa proteica
<i>RTM3</i>	LMV, PPV, TEV	<i>A. thaliana</i>	Meprin/TRAF/CC	Capa proteica
<i>Pvr1, Pvr2</i>	PRSV	<i>Cucumis melo</i>	TIR-NB-LRR	ND
<i>Y-1</i>	PVY	<i>Solanum tuberosum</i>	TIR-NB-LRR	ND
<i>Rsv1</i>	SMV	<i>Glycine max</i>	CC-NB-LRR	P3 + HC-Pro
<i>TuRB01-05</i>	TuMV	<i>Brassica</i> spp.	TIR-NB-LRR	CI e P3
Genes de resistência recessivos	Vírus	Espécie de planta	Fator de tradução	Fator Avr
<i>bc-1, bc-3</i>	BCMV, CIYVV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	eIF4E	VPg, P1/HC-Pro
<i>sbm1/4 (wlv)</i>	BYMV, PSbMV	<i>Pisum sativum</i>	eIF4E	VPg
<i>pvr2+pvr6</i>	ChiVMV, PVMV	<i>Capsicum annuum</i>	eIF4E, eIF(iso)4E	VPg
<i>At3g60240</i>	CIYVV	<i>Arabidopsis thaliana</i>	eIF4G	P1
<i>At4g18040</i>	CIYVV	<i>A. thaliana</i>	eIF4E	P1
Silenciamento (RNAi)	ERV, PepYMV, PepSMV, PepMoV, PVV, PVY, TEV	<i>Solanum lycopersicum</i>	eIF4E	(-)
<i>At5g57870</i>	LMV, PPV	<i>A. thaliana</i>	eIF(iso)4G1	VPg
<i>At5g35620</i>	LMV, PPV, TEV, TuMV	<i>A. thaliana</i>	eIF(iso)4E	VPg
<i>moll, moll²</i>	LMV	<i>Lactuca sativa</i>	eIF4E	VPg, CI, NIa
Silenciamento (RNAi)	MWMV, ZYMV	<i>Cucumis melo</i>	eIF4E	(-)
Silenciamento (RNAi)	PPV	<i>Prunus domestica</i>	eIF(iso)4E	(-)
<i>pvr1, pvr2</i>	PVY, TEV	<i>Capsicum</i> spp.	eIF4E	VPg
<i>pot-1</i>	PVY, TEV	<i>S. lycopersicum</i>	eIF4E	VPg
<i>retr01, retr02</i>	TuMV	<i>Brassica rapa</i>	eIF(iso)4E	VPg
<i>At5g57870, At2g24050</i>	TuMV	<i>A. thaliana</i>	eIF(iso)4G1, eIF(iso)4G2	VPg
<i>At4g34110, At2g23350, At1g49760</i>	TuMV	<i>A. thaliana</i>	PABP2/ 4/ 8	RdRp, VPg

Siglas e abreviaturas: ND – não determinado; (-) – não há fator de avirulência (resistência mediada por RNAi); BYMV – Bean yellow mosaic virus; ChiVMV – Chilli veinal mottle virus; CIYVV – Clover yellow vein virus; ERV – Euphorbia ringspot virus; LMV – Lettuce mosaic virus; MNSV – Melon necrotic spot virus; MWMV – Moroccan watermelon mosaic virus; PRSV – Papaya ringspot virus; PSbMV – Pea seed-borne mosaic virus; PepMoV – Pepino mosaic virus; PepSMV – Pepper severe mosaic virus; PepYMV – Pepper yellow mosaic virus; PPV – Plum pox virus; PVMV – Pepper veinal mottle virus; PVV – Potato virus V; PVY – Potato virus Y; SMV – Soybean mosaic virus; TEV – Tobacco etch virus; **TuMV** – **Turnip mosaic virus**; ZYMV – Zucchini yellow mosaic virus. [Adaptado de Eiras, Dianese e Carvalho-Pereira (2018)]

O gene *TuRB03* foi mapeado em *B. napus* (linagem **22S**) e confere ER (possível imunidade) a um isolado de TuMV (CDN1) classificado como patotipo 4, proveniente do Canadá (HUGHES et al., 2003). Porém, os demais isolados identificados como patotipo 4 foram capazes de superar a resistência dessa linhagem. Os autores sugeriram que, possivelmente, o

isolado CDN1 seria diferente em termos de *Avr* dos outros isolados pertencentes a esse patotipo (HUGHES et al., 2003).

Os genes dominantes *TuRB04* e *TuRB05* foram mapeados na linhagem **165** de *B. napus*. A presença do *TuRB04* está associada à indução de ER em infecções por alguns isolados de TuMV. A presença do *TuRB05*, ao contrário, está associada à indução de HR para alguns isolado de TuMV, o que impede seu movimento sistêmico. O gene *TuRB04* é epistático para o *TuRB05*, ou seja, a presença de um pode mascarar a presença do outro, e juntos conferem ER (possível imunidade) para os patotipos 1 e 3 de TuMV (JENNER et al., 2002; JENNER & WALSH, 2002).

Rusholme et al. (2007) mapearam mais dois genes de resistência em *B. napus*, sendo o primeiro recessivo descrito em *Brassica* e um outro dominante. O recessivo denominado de *recessive TuMVresistance 01 (retr01)*, localizado na porção superior do cromossomo R4, é epistático para o gene dominante *Conditional TuMV resistance 01 (ConTR01)*, localizado na porção superior do cromossomo R8. Em conjunto, os produtos desses genes inibem o início da tradução viral pelos fatores de tradução de eucariontes (eIF), conferindo um amplo espectro de resistência para os patotipos 1, 3, 4, 7, 8, 9 e 12. Qian et al. (2013) mapearam um novo gene de resistência (monogênico e recessivo) ao TuMV, no cromossomo A04, denominado *retr02* na linhagem resistente BP8407 de couve-chinesa (*B. rapa*), o qual confere resistência contra a estirpe C4 de TuMV.

Outros genes dominantes (*TuRBCS01*, *TuRB07*, *TuMV-R*) também foram descritos em *B. rapa*, conferindo resistência à estirpe C4 asiática do TuMV (JIN et al., 2014; LI et al., 2014; CHUNG et al., 2014). Nyalugwe, Barbetti e Jones (2014) mapearam o *TuRBjU 01* cuja a presença está associada à indução de necrose em *B. juncea*, e Liu et al. (2015) também identificaram o *TuNI* associado à indução de necrose em *Arabidopsis* ecotipo *Ler*. Os produtos desses genes interagem com a proteína P3 do TuMV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- O objetivo geral desta tese foi avançar no conhecimento sobre o status da ocorrência, diversidade genética e de alguns aspectos epidemiológicos do TuMV em brássicas no Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Levantamento e identificação de vírus que infectam brássicas no Brasil.
- Caracterização biológica dos isolados de TuMV provenientes de campos de produção de brássicas, para determinação da gama de hospedeiros.
- Classificação dos isolados em patotipos, a fim de se avaliar a capacidade dos isolados brasileiros em contornar os genes de resistência presentes nas linhagens diferenciadoras.
- Caracterização molecular dos isolados de TuMV, por meio do sequenciamento e análises filogenéticas e de recombinação das porções genômicas correspondentes à capa proteica (CP) e inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) parcial, além do sequenciamento completo do genoma de cinco (5) isolados brasileiros.
- Avaliação das eficiências de transmissão do TuMV pelas espécies de afídeos *Aphis fabae*, *Brevicoryne brassicae* e *Myzus persicae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Durante o período de 2014 a 2017 foram realizadas visitas e coletas de amostras em diferentes propriedades rurais, destinadas à produção de brássicas, localizadas em municípios produtores de olerícolas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, além de amostras provenientes de Alagoas, Rio Grande do Sul, Pará e do Distrito Federal, enviadas por pesquisadores colaboradores (Figura 23 e Tabela 3). Durante essas visitas, foram feitas inspeções visuais das espécies cultivadas e da vegetação espontânea, pertencentes à família Brassicaceae, com o intuito de coletar plantas que apresentavam algum tipo de sintoma semelhante aos induzidos por vírus. Além de amostras coletadas nesse período, foram avaliados alguns isolados armazenados, pertencentes à coleção de vírus do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (LFF), Centro de Pesquisa em Sanidade Vegetal do Instituto Biológico (CPSV/IB). As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados com o nome da espécie coletada, local e data de coleta. No laboratório, as amostras foram identificadas e registradas com um código alfanumérico (T + número da amostra) e os sintomas, quando presentes, foram fotografados.

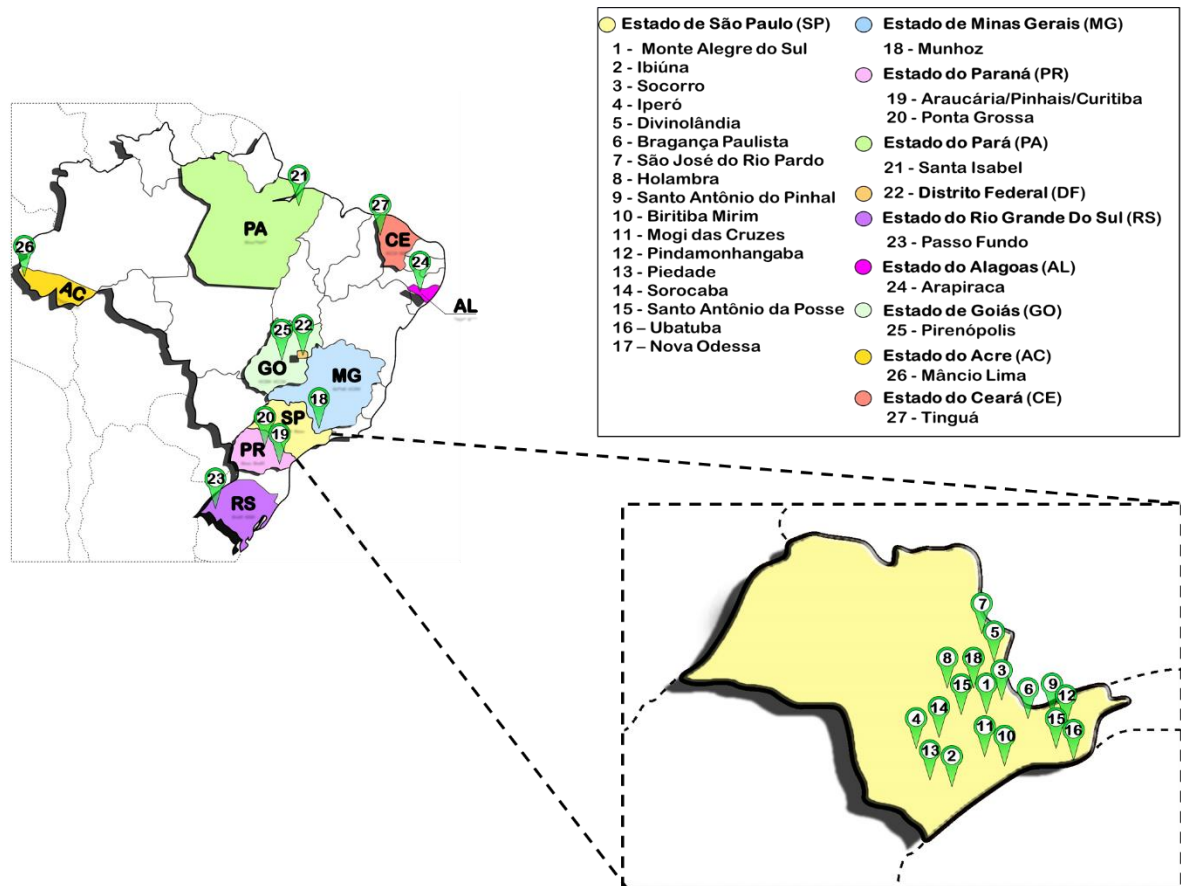


Figura 23 - Estados brasileiros e seus respectivos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras de espécies de brássicas. Em detalhe, o Estado de São Paulo e a indicação dos municípios (números de 1 a 17). (FONTE: O autor)

Tabela 3 - Localização geográfica e número de amostras coletadas em cada município ou Estado amostrado

Número da localidade	Cidade (Estado)	Latitude (Sul)	Longitude (Oeste)	Altitude (m)	Número de amostras
1	Monte Alegre do Sul (SP)	22° 40' 55"	46° 40' 51"	750	3
2	Ibiúna (SP)	23°39'25"	47°13'33"	996	11
3	Socorro (SP)	22° 35' 29"	46° 31' 44"	752	4
4	Iperó (SP)	23° 21' 01"	47° 41' 19"	590	2
5	Divinolândia (SP)	21° 39' 41"	46° 44' 21"	1058	8
6	Bragança Paulista (SP)	22° 57' 07"	46°32'31"	817	1
7	São José do Rio Pardo (SP)	21°35'44"	46°53'19"	705	2
8	Holambra (SP)	22°37'59"	47°03'20"	600	1
9	Santo Antônio do Pinhal (SP)	22°49'38"	45°39'45"	1080	7
10	Biritiba Mirim (SP)	23°34'21"	46°02'19"	780	13
11	Mogi das Cruzes (SP)	23°31'22"	46°11'18"	742	5
12	Pindamonhangaba (SP)	22°55'26"	45°27'42"	557	3
13	Piedade (SP)	23°42'43"	47°25'40"	781	5
14	Sorocaba (SP)	23°30'06"	47°27'29"	601	2
15	Santo Antônio da Posse (SP)	22°36'22"	46°55'10"	695	1
16	Ubatuba (SP)	23°26'02"	45°04'16"	3	1
17	Nova Odessa (SP)	22°46'39"	47°17'45"	570	1
18	Munhoz (MG)	22°36'47"	46°21'38"	1235	3
19	Araucária (PR)	25°35'35"	49°24'37"	897	10
19	Pinhais (PR)	25°26'41"	49°11'33"	893	2
19	Curitiba (PR)	25°25'42"	49°16'24"	925	2
20	Ponta Grossa (PR)	25°05'42"	50°09'43"	969	6
21	Santa Isabel do (PA)	01°17'55"	48°09'38"	24	5
22	Brasília (DF)	15°46'46"	47°55'46"	1136	1
23	Passo Fundo (RS)	28°15' 40"	52°24'30"	680	2
24	Arapiraca (AL)	09°45'09"	36°39'40"	264	1
25	Pirenópolis (GO)	15°51'09"	48°57'33"	770	2
26	Mâncio Lima (AC)	07°36'51"	72°53'45"	195	1
27	Tinguá (CE)	03°43'56"	40°59'30"	775	3

4.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE TuMV

4.2.1 INOCULAÇÃO MECÂNICA E GAMA DE HOSPEDEIROS

A gama de hospedeiros foi realizada com cinco isolados brasileiros de TuMV (T06, T22, T31, T48 e T61), os quais foram selecionados a partir da hospedeira, local de origem e sintomas observados no campo. Para a determinação da gama de hospedeiros, foram avaliadas plantas de diversas espécies pertencentes às famílias Brassicaceae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Poaceae, Cucurbitaceae, entre outras (Tabela 4 e Tabela 5). As sementeiras foram feitas em bandejas de polipropileno (6 cm de altura x 28 cm de largura x 33 cm de comprimento), utilizando como substrato terra previamente esterilizada (autoclavagem de 30 minutos). Aproximadamente quinze dias após a germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos de polipropileno (10 cm de diâmetro x 6 cm de altura), também contendo terra

previamente esterilizada. As plantas foram inoculadas quando possuíam pelo menos duas folhas verdadeiras. O extrato vegetal de cada isolado viral foi preparado a partir de folhas infectadas, em presença de tampão fosfato acrescido de sulfito de sódio 0,01M pH 6,0 (0,5% de sulfito de sódio, 1,06g de Na₂HPO₄ e 0,54g de KH₂PO₄) na proporção de 1:5 (g:mL), adicionando-se carbeto de silício (carborundum) 400 *mesh* como abrasivo (SILVA et al., 2012). Os extratos foram friccionados na parte adaxial das folhas verdadeiras das plantas testes. Como controle foram utilizadas plantas das mesmas espécies e mesmas idades, cujas folhas foram inoculadas apenas com tampão e carborundum. Após as inoculações, as plantas foram lavadas com água e mantidas em casa de vegetação. Para a confirmação da infecção, as plantas inoculadas foram submetidas, trinta dias após as inoculações, à detecção do vírus por DAS-ELISA (ITEM 4.2.3).

Tabela 4 - Espécies de plantas cultivadas submetidas à inoculação mecânica com os cinco diferentes isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) selecionados para a determinação da gama de hospedeiros

Família	Nome científico	Nome comum
Aizoaceae	<i>Spinacia oleracea</i>	Espinafre
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i>	Alface-lisa
Brassicaceae	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Couve-flor
	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Brócolis
	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	Couve-rábano
	<i>B. rapa</i>	Mostarda-crespa
	<i>B. rapa</i>	Mostarda-japonesa
	<i>B. rapa</i>	Mostarda-lisa
	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	Couve-chinesa
	<i>Eruca sativa</i>	Rúcula
	<i>Raphanus sativus</i>	Rabanete
	<i>Mathiola incana</i>	Goivo
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	Abobrinha
	<i>Cucumis sativus</i>	Pepino-caipira
Fabaceae	<i>Cajanus cajan</i>	Feijão-guandu
	<i>Pisum sativus</i>	Ervilha
Orchidaceae	<i>Phalaenopsis</i> sp.	Orquídea
Poaceae	<i>Avena sativa</i>	Aveia
	<i>Zea mays</i>	Milho
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>	Pimentão
	<i>Solanum melongena</i>	Berinjela

Tabela 5 - Espécies de plantas indicadoras e da vegetação espontânea submetidas a inoculação mecânica com cinco diferentes isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) selecionados para a determinação da gama de hospedeiros

Família	Nome científico	Nome comum
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	Perpétua
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Nabiça
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Quenopódio
Commelinaceae	<i>Commelina</i> sp.	Trapoeraba
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	Trombeteira
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Tabaco selvagem
	<i>N. debneyi</i>	-
	<i>N. glutinosa</i>	Glutinosa
	<i>N. megalosiphom</i>	-
	<i>N. tabacum</i> Samsun NN	-
	<i>N. tabacum</i> White Burley	-
	<i>N. tabacum</i> Xanthi	-
	<i>N. sylvestris</i>	-
	<i>Physalis floridana</i>	Físalis
	<i>Solanum americanum</i>	Maria pretinha

4.2.2 PATOTIPAGEM DOS ISOLADOS VIRAIS

Para a realização da patotipagem, foram selecionados treze (13) isolados de turnip mosaic virus (TuMV), de acordo com a severidade dos sintomas observados no campo, localização geográfica e hospedeiras (Tabela 6). A determinação dos patotipos⁷ foi realizada por meio de inoculação mecânica (ITEM 4.2.1) em cinco linhagens diferenciais de *Brassica napus* (S1, S6, R4, 165 e 22S) que contêm ou não genes de resistência ao TuMV. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em estufa ou câmara de crescimento com temperatura ($18 \pm 25^\circ\text{C}$) e luminosidade (12 horas de luz) controladas (Figura 24) durante um período de 30 dias. Foram realizadas leituras semanais dos sintomas induzidos nas plantas diferenciais inoculadas que, ao final, também foram analisadas por PTA-ELISA (ITEM 4.2.4) para a confirmação, ou não, da infecção viral. Os resultados dos sintomas observados e de ELISA foram compilados e comparados com os trabalhos desenvolvidos por Jenner e Walsh (1996) e Hughes et al. (2003) (Tabela 7).

⁷Patotipo - designação para diferenciar isolados virais de acordo com a patogenicidade, que pode corresponder à capacidade do isolado viral superar (ou não) a resistência conferida por um gene (HULL, 2014)



Figura 24 - Locais onde foram realizados os experimentos de patotipagem dos treze (13) isolados de turnip mosaic virus (TuMV) selecionados neste trabalho. (A) Câmaras com temperatura e luminosidade controladas da empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda., localizada no município de Bragança Paulista, SP; (B) Estufas climatizadas da Universidade de Warwick, Reino Unido. (FONTE: O Autor)

Tabela 6 - Isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) selecionados para a patotipagem

Isolados	Hospedeira nome científico (nome comum)	Local de coleta (município/Estado)
T03	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (couve-flor)	Ibiúna (SP)
T06	<i>Amoracia rusticana</i> (raiz-forte)	Divinolândia (SP)
T21	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Munhoz (MG)
T22	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Munhoz (MG)
T24	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Bragança Paulisata (SP)
T26	<i>B. rapa</i> spp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Divinolândia (SP)
T31	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Sto. Antônio do Pinhal (SP)
T34	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Sto. Antônio do Pinhal (SP)
T48	<i>B. rapa</i> spp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim (SP)
T57	<i>R. sativus</i> (rabanete)	Biritiba Mirim (SP)
T60	<i>B. rapa</i> (pak-choi)	Mogi das Cruzes (SP)
T61	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Mogi das Cruzes (SP)
T81	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Araucária (PR)

Tabela 7 - Diferenciação dos isolados de turnip mosaic virus (TuMV) em patotipos de acordo com as reações de linhagens de *Brassica napus* segundo Jenner e Walsh (1996) e Hughes et al. (2003)

Patotipos	Linhagens				
	S6	R4	165	S1	22S
1	+	O	O	+	+ _N
2	R	R	O	R	-
3	+	+ _N	O	+	O/+ _N
4	+	+	+	+	+/O
5	+	+	O	+	
6	+	+ _N	O	R	
7	+	O	O	R	
8	+	+ _N	R _N	R	
9	+	R _N	O	R	
10	+	+	O	O	
11	R	+	O	R	
12	+	+	+ _N	+	

Legenda: (O) sem infecção; (+) sintoma sistêmico; (+_N) necrose sistêmica; (R) resistente (latência); (R_N) resistente com sintoma de necrose local.

4.2.3 DOUBLE ANTIBODY SANDWICH – ELISA (DAS-ELISA)

Para a detecção sorológica do TuMV, os antígenos foram preparados triturando-se 0,1 g de tecido foliar de cada amostra coletada em 1.000 µL de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4 (acrescido de 1,3 g de Na₂SO₃, 0,5% de “Tween 20”, 20 g de polivinilpirrolidona, 0,2 g de NaN₃ e 2,0 g de albumina de ovo para 1000 mL de água destilada). Como controles (negativos e positivos) foram utilizados tecidos foliares liofilizados comerciais para o TuMV (fornecidos pela Agdia®). As amostras (antígenos), após o processamento, foram mantidas a -20°C, seguindo recomendações do fabricante. Inicialmente, placas para microtitulação tipo ELISA, estéreis, com 96 cavidades e fundo chato foram sensibilizadas com 50 µL do antissoro de captura policlonal contra a capa proteica (CP) do vírus (Agdia®) diluído na proporção de 1:200 (antissoro: tampão) em tampão carbonato de sódio 0,05M, pH 9,6 (1,59 g de Na₂SO₃, 2,93 g NaHCO₃, 0,2 g NaN₃ para 1000 mL de água destilada). Para cada amostra avaliada, incluindo os controles, foram sensibilizadas três cavidades (triplicatas). Após este procedimento, as placas foram incubadas por 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a lavagem (3x) com tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4 (acrescido de 0,5% de “Tween20”). Após as lavagens, foram aplicados 50 µL dos antígenos previamente preparados bem como os controles (positivos e negativos). As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e, em seguida, foram lavadas (3x) como descrito anteriormente. Para cada cavidade sensibilizada, procedeu-se a aplicação de 50 µL dos anticorpos anticoelho A e B

(Agdia[®]) conjugados à enzima fosfatase alcalina previamente diluídos na proporção 1:200 (antissoro: tampão) em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4 [acrescido de 2,0 g de soro albumina bovina (BSA)], 2% de polivinilpirrolidona e 0,2 g de NaN₃ para 1000 mL de água destilada). Procedeu-se, então, nova incubação por 2 horas a temperatura ambiente seguida de lavagem (3x). Em seguida, adicionou-se o substrato p-nitrofenilfosfato (Sigma[®]), diluído em tampão substrato pH 9,8 (9,7 mL de dietolonamina, 0,01 g de MgCl₂, 0,02 g de NaN₃ em 100 mL de água destilada) na proporção 0,001:1 (g:mL). Após 30 minutos de incubação a 37°C, foram realizadas as leituras de absorbância (A₄₀₅) utilizando-se o aparelho *Microplate Reader 3550-UV* (Bio-Rad). As amostras foram consideradas positivas quando a média das absorbâncias, em triplicatas, foram três vezes superiores à média das absorbâncias dos controles negativos (CLARK & ADAMS, 1977).

4.2.4 PLATE TRAPPED ANTIGEN – ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (PTA-ELISA)

O antissoro policlonal (não comercial) utilizado para o teste de PTA-ELISA foi gentilmente cedido pelo pesquisador John A. Walsh da Universidade de Warwick, Reino Unido. Este teste foi realizado para comprovação da infecção do TuMV nas linhagens de *B. napus* empregadas na patotipagem viral (ITEM 4.2.2). As folhas foram coletadas e maceradas em presença de tampão carbonato de sódio 0,05M, pH 9,6 (1,59 g de Na₂SO₃, 2,93 g NaHCO₃, 0,2 g NaN₃ para 1000 mL de água destilada) na proporção 1:1 (macerado: tampão). Como controles positivos foram utilizadas plantas de mostarda-lisa (*B. rapa*) previamente inoculadas com o TuMV, e os controles negativos eram constituídos de folhas de mostarda-lisa sadias. As amostras foram incubadas por 12 horas em câmara fria (4°C). No dia seguinte, procedeu-se a lavagem (3x) das placas com tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 (acrescido de 0,5% de “Tween20”). Em seguida, foram aplicados 150 µL de antissoro, previamente diluído em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 (acrescido de 0,5% de “Tween20” e 2% de BSA) na proporção 1:500 (antissoro: tampão). As placas foram então incubadas por 2 horas a temperatura ambiente para serem novamente lavadas (3x), como descrito anteriormente. Em seguida, foram aplicados 150 µL de anticabra (Agdia[®]), conjugado à enzima fosfatase alcalina, previamente diluído em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 (acrescido de 0,5% de “Tween20” e 2% de BSA) na proporção 1:2000 (antissoro:tampão). As placas foram novamente incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e, em seguida, procederam-se novas lavagens (3x). Em seguida, adicionou-se o substrato p-nitrofenilfosfato (Sigma[®]), diluído em tampão substrato pH 9,8 (9,7 mL de

dietolonamina, 0,01g de $MgCl_2$, 0,02g de NaN_3 em 100 mL de água destilada) na proporção 1:5 (pastilha: tampão). Cerca de 30 min após a incubação a temperatura ambiente e no escuro, foram feitas as leituras de absorvância utilizando-se o aparelho modelo *EZ-READ 400* (Biochrom), com comprimento de onda em 405 nm. As amostras foram consideradas positivas quando os resultados das absorvâncias observadas foram três vezes superiores à média das absorvâncias dos controles negativos (CLARK & ADAMS, 1977).

4.3 TESTES DE TRANSMISSÃO POR AFÍDEOS

Para a realização dos testes para simular a transmissão primária do TuMV, foram selecionadas três espécies de afídeos: *Aphis fabae*, *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae*. Essas espécies foram obtidas a partir de colônias estabelecidas em plantas da vegetação espontânea (*Solanum americanum*, maria-pretinha) e em variedades comerciais de brássicas como mostarda (*Brassica rapa*) e couve (*Brassica oleracea*). Para a garantia de que as colônias de afídeos eram puras, espécimes de cada uma foram coletados e, com auxílio de um microscópio estereoscópico e chaves de identificação específicas, foram devidamente identificados (CHANEY & LEE, 1992; EASTOP, COSTA & BLACKMAN, 1993; COSTA, EASTOP & BLACKMAN, 1993; BLACKMAN & EASTOP, 2000). Após a identificação, exemplares ápteros adultos de cada espécie foram transferidos para plantas saudáveis das mesmas espécies vegetais que foram capturados e mantidos em gaiolas com tela anti-afídeos a temperatura ambiente até o total estabelecimento das colônias.

Em seguida, avaliou-se a transmissão massal e a eficiência de transmissão individual do TuMV por espécie de afídeo, além da simulação experimental da possível rota de disseminação do vírus, utilizando diferentes fontes de inóculo, de uma espécie de brássica cultivada para uma espécie não cultivada (vegetação espontânea) e vice-versa. Foram avaliados seis tratamentos: (i) transmissão de mostarda (*Brassica rapa*) para mostarda com 5 afídeos por planta (Figura 25A); (ii) transmissão de mostarda para mostarda com apenas um afídeo por planta; (iii) transmissão de mostarda para nabiça (*Raphanus raphanistrum*) com um afídeo por planta; (iv) transmissão de nabiça para mostarda com um afídeo por planta; (v) transmissão de nabiça para nabiça com um afídeo por planta; (vi) plantas saudáveis (testemunha) (Figura 25B). Cada experimento foi constituído de três repetições contendo sete plantas por repetição. As fontes de inóculo utilizadas foram plantas de mostarda e nabiça, previamente inoculadas mecanicamente (ITEM 4.2.1) e indexadas por DAS-ELISA (ITEM 4.2.3). Os afídeos foram mantidos em jejum por uma hora e em seguida submetidos a um período de acesso à aquisição

(PAA) de 5 minutos, e período de acesso à inoculação (PAI) também de 5 minutos. Como testemunha foram utilizados afídeos que se alimentaram de plantas saudias (livres de vírus).

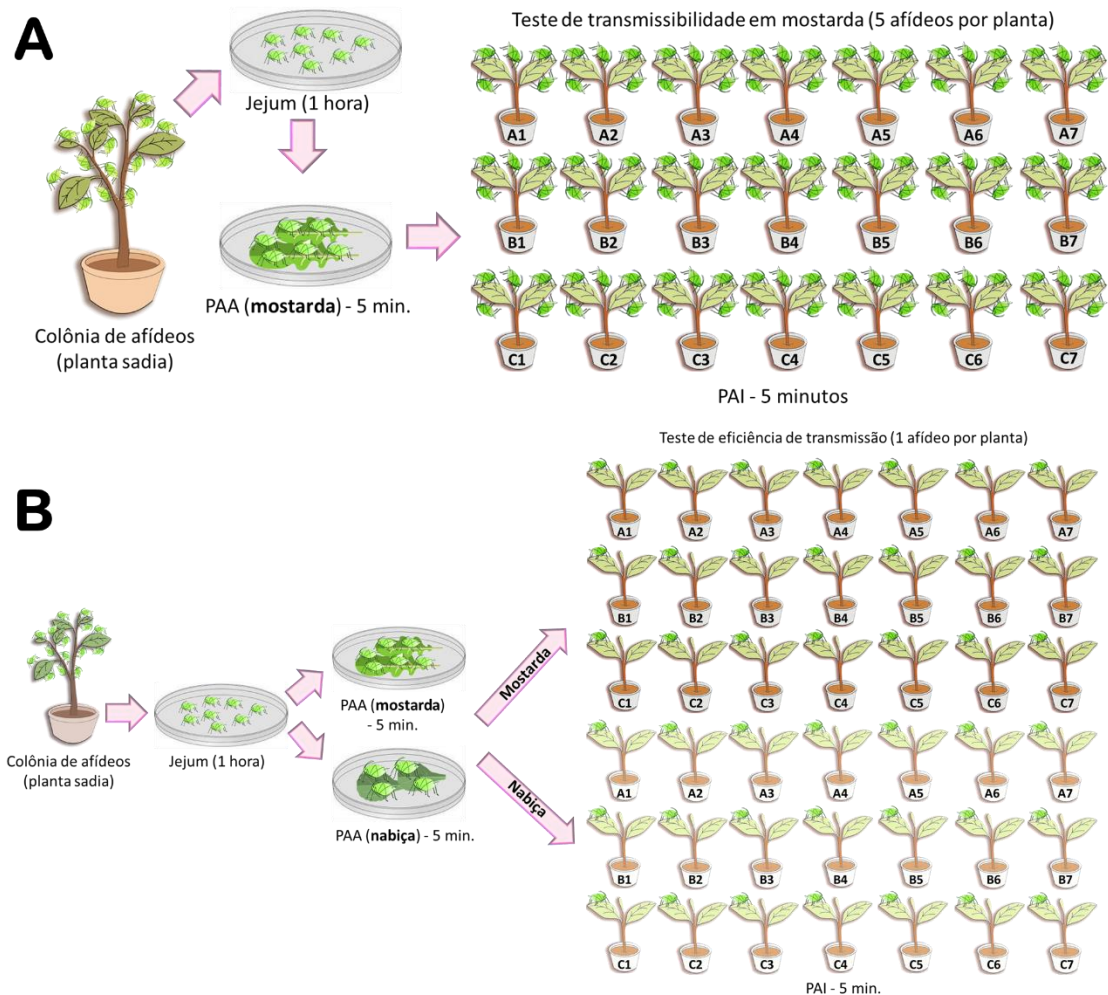


Figura 25 – Teste para simular a transmissão primária utilizando três espécies de afídeos. (A) Teste de transmissibilidade das espécies de afídeos utilizando 5 afídeos por planta; (B) Testes de eficiência e rota de transmissão de uma espécie de brássica cultivada (mostarda) para espécie cultivada (mostarda) e para uma espécie da vegetação espontânea (nabiça) e vice-versa. (PAA): período de acesso à aquisição; (PAI): período de acesso à inoculação. (FONTE: O autor)

Após os testes de transmissão as plantas foram mantidas em casa de vegetação (sem controle de temperatura e luminosidade), e a evolução dos sintomas foi acompanhada semanalmente por um período de 30 dias. Após esse período, foram coletadas amostras foliares individuais das plantas, que foram submetidas a DAS-ELISA (ITEM 4.3.2) para confirmação ou não da infecção por TuMV. Para análise estatística dos resultados visuais dos sintomas

induzidos pelo TuMV juntamente com os de DAS-ELISA, foi utilizado o programa Sisvar 5.6, utilizando o modelo estatístico de blocos casualizados com *Tukey* a 0,1%.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE MATERIAL VEGETAL

Para a extração de RNA total partiu-se de 0,1 g de tecido foliar. Com o auxílio de almofariz e pistilo (previamente esterilizados), procedeu-se a maceração das amostras em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de uma preparação em estado de pó fino. Para cada amostra triturada, adicionou-se 1 mL de *TRizol*[®] *Reagent* (Invitrogen), cuja mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, transferiu-se a amostra para microtubos de 1,5 mL (livres de RNAses) e adicionaram-se 200 µL de clorofórmio. Esta mistura foi submetida a agitação vigorosa em agitador (*vortex*), incubada por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugada à 12.000 rpm (rotor fixo modelo FA-45-30-11 da centrifuga Eppendorf modelo 5417R) por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para microtubos novos de 1,5 mL (livres de RNAses) adicionando-se, em seguida, 500 µL de álcool isopropílico. Após homogeneização por inversão, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e submetidas a mais 10 minutos de centrifugação a 12.000 rpm, à 4°C. A fase aquosa foi descartada e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo a amostra novamente submetida a 5 minutos de centrifugação a 12.000 rpm a 4°C. Em seguida, o microtubo contendo o RNA extraído foi mantido em posição invertida com tampa aberta por um período aproximado de 15 minutos até a total evaporação do etanol. O precipitado foi então ressuspendido em 40 µL de água estéril previamente autoclavada e livre de RNAses e armazenado a -80°C.

Para o envio das amostras para o sequenciamento completo (ITEM 4.9), foram realizadas duas extrações de RNA distintas. No entanto, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. A primeira foi realizada a partir de preparação de vírus purificados (ITEM 4.6), sendo utilizados 50 µL para a extração do RNA, não havendo qualquer outra alteração no protocolo. A segunda estratégia utilizada para as extrações de RNA, foi a partir de 5 g de folhas de mostarda infectada experimentalmente (ITEM 4.2.1) com cada isolado de TuMV selecionado. A quantidade de reagentes utilizados, nesta estratégia, foi proporcional ao peso de tecido foliar utilizado, sem qualquer outra alteração no protocolo descrito acima.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

As extrações de DNA foram realizadas principalmente para a detecção de isolados do cauliflower mosaic virus (CaMV) por PCR, uma vez que esse vírus tem genoma constituído de DNA. Partiu-se de 0,1 g de folha fresca por amostra. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O macerado foi transferido para microtubos de 1,5 mL (livres de RNAses), sendo, em seguida, 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, a seguir, submetidas a uma agitação vigorosa (em *vortex*) e incubadas a 65°C por 5 minutos. Foram, então, adicionados 150 µL de acetato de potássio 5M e as amostras foram novamente submetidas a agitação vigorosa (em *vortex*), sendo os microtubos mantidos em gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos, à 80, 10.000 rpm (rotor fixo modelo FA-45-30-11 da centrifuga Eppendorf modelo 5417R), sendo o sobrenadante transferido para novos microtubos de 1,5 mL (livres de RNAses). Adicionaram-se, a seguir, 350 µL de isopropanol e os microtubos foram agitados por inversão e novamente 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. Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água estéril (livre de RNAses).

4.6 SEMIPURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS VIRAIS

Cinco (5) isolados brasileiros de TuMV (T06, T22, T31, T48, T61), previamente identificados, foram selecionados para serem purificados. A escolha dos isolados foi feita com base no local de coleta, hospedeiro e sintomas. Inicialmente, os isolados virais foram inoculados mecanicamente (ITEM 4.2.1) em aproximadamente 200 plantas de mostarda-lisa (*Brassica rapa*). Três semanas após a inoculação, quando as plantas já expressavam sintomas, as folhas foram coletadas e homogeneizadas em liquidificador na presença de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 na proporção 2:1 (g:mL). O extrato obtido foi filtrado em gaze e transferido para um Becker, sendo adicionados 4% de TritonTM X-100 (Sigma) e submetidos a agitação por 12 horas a 4°C. Em seguida, o extrato foi distribuído em tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm (rotor fixo modelo FA-45-30-11 da centrifuga Eppendorf modelo 5417R) a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de

ultracentrífuga, contendo 5 mL de sacarose (30%) diluída em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 (acrescido de EDTA 0,005M, Na₂SO₄ 0,02M e DIECA 0,01M), denominado “colchão” de sacarose. A transferência foi feita com os tubos inclinados, acrescentando-se cuidadosa e lentamente o sobrenadante sobre o “colchão” de sacarose (30%). Em seguida, realizou-se a ultracentrifugação por 3 horas a 32.000 rpm (rotor Sorval modelo T-865). Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água destilada com o intuito de se retirar todo o excesso da sacarose. A seguir, o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato (acrescido de EDTA 0,005M, Na₂SO₄ 0,02M e DIECA 0,01M). Os volumes dos materiais ressuspensionados foram mesclados em um único tubo, sendo uma alíquota enviada para a observação da presença e integridade das partículas virais em microscopia eletrônica de transmissão (ITEM 4.12) (DUFFUS, LARSEN & LIU, 1986).

4.7 AMPLIFICAÇÃO POR PCR (POLYMERASE CHAIN REACION)

Foram realizadas análises por RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) para o TuMV e o CoLV, além de PCR para o CaMV. Para a realização das transcrições reversas, foram utilizados microtubos estéreis (livres de RNAses) contendo 3 µL de RNA total (não quantificado), 1 µL do oligonucleotídeo complementar (50 pmoles/µL) e água livre de RNases para um volume total de 10 µL. Os tubos foram incubados a 70°C durante 3 minutos e imediatamente transferidos para gelo. Em seguida, adicionaram-se 5 µL de tampão (5x) da enzima transcriptase reversa (Promega), 1 µL de desox

irribonucleotídeos trifosfato (dNTPs, 2,5 mM), 1 µL da enzima transcriptase reversa MML-V (200U/µL, Promega), completando o volume da reação com água estéril (livre de RNases) para 25 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Para as reações de PCR foram adicionados 0,5 µL da enzima DNA polimerase Go Taq[®] Flexi (5U/µL, Promega), 10 µL de tampão (5x), 3 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 1 µL de dNTPs (2,5mM), 1 µL de cada oligonucleotídeo (forward e reverse) (50 pmoles/µL) (Tabela 8 e Figura 27). As amostras foram amplificadas em termociclador PTC100 (MJ Research). Para os isolados de TuMV, foram realizadas ampliações de duas regiões distintas do genoma, a inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) e capa proteica (CP). As condições de amplificação para a região da CI foram: 5 min a 92°C, seguido de 40 ciclos de 50s a 92°C, 1 min a 54°C e 1 min e 30s a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C (Tabela 8 e Figura 26A). Já para a região CP as condições foram: 15 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 54°C e 60s a 72°C, com uma extensão final de 10 min a 72°C (Tabela 8 e Figura 26A). Para os isolados de CoLV,

foram realizadas amplificações da região correspondente à CP e a porção terminal 3' UTR do RNA viral. As condições utilizadas nos ciclos de amplificação foram: 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclo de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C (Tabela 8 e Figura 26B). Já para o CaMV, foram realizadas amplificações que compreenderam a porção genômica da proteína de movimento (ORF1) do vírus e as condições foram: 5 min a 92°C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C, com extensão de 5 min a 72°C (Tabela 8 e Figura 26C). Após as amplificações por PCR, os fragmentos de DNA foram submetidos a eletroforese em géis de agarose 1%, com exceção do fragmento de CoLV de 130 pb que foi submetido eletroforese em gel de agarose 2%, em presença de brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

Tabela 8 - Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados nas reações de RT-PCR para o turnip mosaic virus (TuMV) e o cole latent virus (CoLV), e PCR para o cauliflower mosaic virus (CaMV)

Vírus	Região genômica	Primers	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	Fragmento	Referência
TuMV	CP	CP - F (h)	5' – AAGCAATCTTTGAGGATTATG – 3'	986 pb	Jenner et al. (2002)
		CP - R (c)	5' – TATTTCCCATTAAGCGAGAATAC -3'		
	CI	CI - F (h)	5' GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC – 3'	700 pb	Ha et al. (2008)
		CI - R (c)	5' – ACICCRTTYTCDATDATRTTIAGTIGC –		
CoLV		Carla – Uni (h)	5' – GGAGTAACCGAGGTGATAACC – 3'	130 pb	Belintani et al. (2002)
		Oligo dT ₂₁ (c)	5' – TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'		Pappu et al. (1993)
	CP	Carla – CP (h)	5' – GGBYTNGGBBTNCNCANGA – 3'	940 pb	Gaspar et al. (2008)
		CoLV I – F (h)	5' – ATGCGCCCAGATCCC – 3'	363 pb	Desenvolvidos neste trabalho
		CoLV II – R	5' – TACATGTTRACGCACAACGC – 3'		
CaMV	ORF1	CaMV – F (h)	5' – AGCAAGCAATCGCATAATCT- 3'	361 pb	López-Moya et al. (1992)
		CaMV – R (c)	5' – GCTCAAAGATGAACCATGGA – 3'		

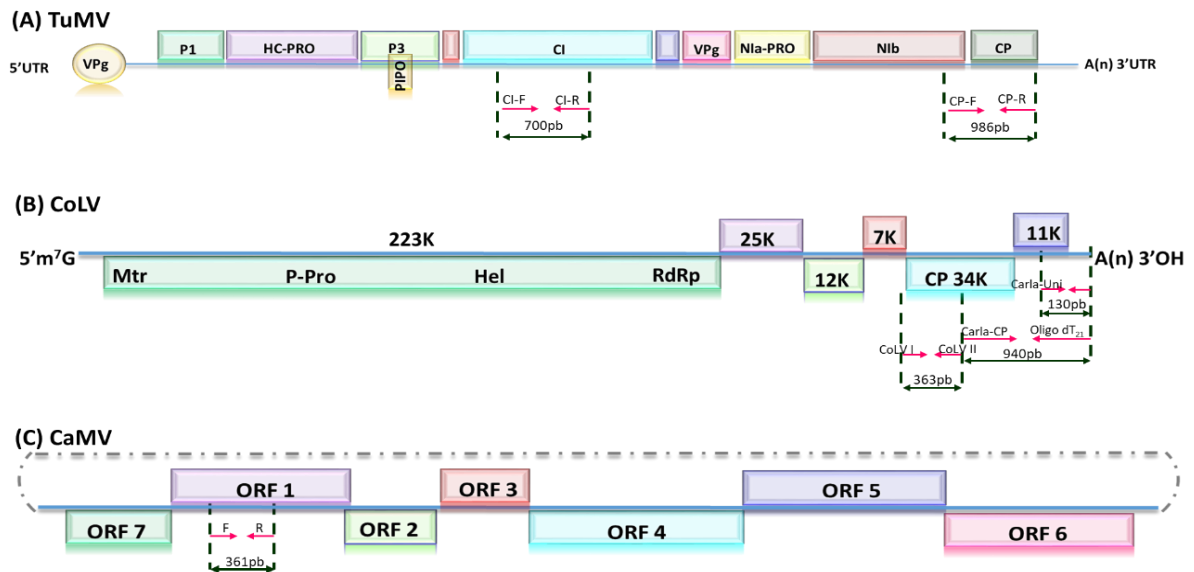


Figura 26 - Esquemas dos genomas dos vírus de brássicas identificados neste trabalho com os respectivos sítios de anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para as reações de RT-PCR e PCR. (A) turnip mosaic virus (TuMV), (B) cole latent virus (CoLV) e (C) cauliflower mosaic virus (CaMV). (FONTE: O autor)

4.8 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os produtos de DNA amplificados via RT-PCR e PCR foram eluídos dos géis de agarose com o kit *Pure Link® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos de DNA purificados foram então sequenciados pelo método de terminação em cadeia (SANGER, NICKLEN & COULSON, 1977) com o kit *Big Dye* (Applied Biosystems) e o sequenciador 3500 XL (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante.

4.9 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

Para o sequenciamento completo do genoma de cinco isolados brasileiros de TuMV (T06, T22, T31, T48, T61), empregou-se a estratégia de sequenciamento em larga escala *Next generation sequencing* (NGS) – sequenciamento de nova geração. Os isolados virais, inoculados e mantidos em plantas de mostarda-lisa (*B. rapa*), foram selecionados de acordo com o hospedeiro, tipo de sintoma induzido e origem geográfica. Cerca de 25 dias após as inoculações, folhas infectadas (de plantas inoculadas por cada isolado viral) foram coletadas e submetidas à extração de RNA total (ITEM 4.4) e purificação com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Os RNAs purificados dos cinco isolados virais foram encaminhados para sequenciamento no

Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ, USP, Piracicaba, SP). Inicialmente, avaliou-se a qualidade dos RNAs utilizando o aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer System* (Agilent Technologies). Em seguida, as amostras foram submetidas a sequenciamento utilizando o *HiSeq 2500 Technology*. A biblioteca genômica e o sequenciamento foram realizados utilizando o *Illumina TruSeq Stranded mRNA Prep Kit* e o *HiSeq SBS v4 Output Kit*, respectivamente (Illumina, Inc., San Diego, CA). Os dados obtidos pelo *HiSeq 2500* (Illumina, Inc., San Diego, CA) foram analisados com o auxílio do programa *Real Time Analysis* para a obtenção do *base call* das imagens, convertendo estas para o formato *Fastq*. Em seguida, foi realizada a avaliação inicial das leituras das sequências com o programa *FastQC* versão 0.11.5 (EWING & GREEN, 1998). A filtragem das bases com baixa qualidade e das sequências de adaptadores foi realizada com o pacote *BBTools* versão 37.10. A seguir, as leituras do sequenciamento foram filtradas utilizando-se o programa *BBDuk* com o auxílio de uma sequência completa do genoma de um isolado de TuMV já depositada no GenBank, sendo possível eliminar as sequências sem similaridade. Para a montagem do genoma, foram utilizados dois programas: (i) *Tadpole* (pacote *BBTools*), empregando os parâmetros $K=15$ e (ii) *Trinity* versão 2.4.0. (GRABHERR et al., 2011). Os *contigs* resultantes foram filtrados utilizando o programa *BLAST* (BORATYN et al., 2013), mantendo apenas os *contigs* com mais de 90% de cobertura e identidade com o TuMV. Finalmente, os *contigs* restantes foram realinhados utilizando o programa *CAP3* versão 02/10/15 (HUANG & MADAN, 1999).

4.10 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA E FILOGENIA

As sequências de DNA obtidas das regiões genômicas referentes à capa proteica (CP) e inclusão citoplasmática cilíndrica (CI), além do sequenciamento completo dos 5 isolados de TuMV, foram comparadas com sequências já depositadas no *Genbank* de acordo com trabalho realizado por Nguyen et al. (2013) (Tabela 9), com o auxílio do programa *Local Alignment Search Tool* (*BLASTn*), do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Os alinhamentos múltiplos de nucleotídeos foram realizados com o programa *BioEdit* 7.2.1. As análises filogenéticas foram feitas com o auxílio do programa *MEGA* (versão 6), utilizando os métodos de distância (*Neighbor Joining*), além de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) com análises de *Bootstrap* para 1.500 replicações, e editadas com o auxílio do *TreeGraph* 2.14.0. As análises de recombinação foram realizadas com o auxílio do programa *RDP3* (MARTIN et al., 2010).

Tabela 9 - Isolados de turnip mosaic virus (TuMV), com sequências completas do genoma depositadas no Genbank, utilizados nas análises filogenéticas

Código do isolado	Código no Genbank	Hospedeiro	Data de coleta	Localidade do Isolado
OS	AB701693	<i>Orchis símia</i>	1981	Celle – Alemanha
ORM	AB701692	<i>Orchis morio</i>	1983	Celle – Alemanha
OM-A	AB701691	<i>Orchis militaris</i>	1981	Celle – Alemanha
ASP	AB701697	<i>Allium</i> sp	1995	Gatersleben – Alemanha
ITA2	AB701721	<i>Cheiranthus cheiri</i>	1992	Campania – Itália
GK1	AB701696	<i>Matthiola incana</i>	1989	Grécia
ITA1A	AB701720	<i>Brassica ruvo</i>	1990	Campania – Itália
GRC42	AB252117	<i>Allium</i> sp (Wild)	1999	Grécia
AI	AB093598	<i>Alliaria officinalis</i>	1968	Piemonte – Itália
IS1	AB093602	<i>Allium ampeloprasum</i>	1993	Israel
IRNTa6	AB440238	<i>Rapistrum rugosum</i>	2004	Varamin, Tehran – Iran
IRNSS5	AB440239	<i>Sisymbrium loeselii</i>	2003	Varamin, Tehran – Iran
TIGA	AB701734	<i>Tigridia</i> sp.	1983	Braunschweig – Alemanha
TIGD	AB701735	<i>Tigridia</i> sp.	1983	Braunschweig – Alemanha
ITA8	AB701725	<i>Abutilon</i> sp.	1993	Piemonte – Itália
ITA7	AB093600	<i>Raphanus raphanistrum</i>	1990	Campania – Itália
Cal1	AB093601	<i>Calendula officinalis</i>	1979	Ligúria – Itália
KWB779	AB252125	<i>Brassica rapa</i>	2004	Takamatsu, Kagawa – Japão
TUR9	AB362513	<i>Raphanus sativus</i>	2005	Balikesir, Marmora – Turquia
CH6	AB252103	<i>Raphanus sativus</i>	1999	Zengjiang, Jiangsu – China
HDR	AB093627	<i>Raphanus sativus</i>	1988	Hongzhou, Zhejiang – China
BEL1	AB701698	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	1986	Wavre – Bélgica
RUS1	AB093606	<i>Armoracia rusticana</i>	1993	Rússia
GBR83	AB701717	<i>Brassica oleracea</i> (Wild)	2002	Llandudno, Conwy – Reino Unido
DRT1	AB701729	<i>Brassica oleracea acephala</i>	1993/94	Madeira – Portugal
BZ1	AB093611	<i>Brassica oleracea</i>	1996	Distrito Federal – Brasil
FRA2	AB701708	<i>Brassica napus</i>	1994	França
GBR8	AB701717	<i>Brassica oleracea</i> (Wild)	2002	Llandudno, Conwy – Reino Unido
CZE5	AB252107	<i>Brassica rapa</i>	1993	Ceske Budejovice – República Tcheca
POL1	AB701728	<i>Brassica napus oleifera</i>	1993	Poznan – Polônia
POL2	AB701731	<i>Papaver somniferum</i>	1993	Czempin – Polônia
DEU2	AB701700	<i>Raphanus sativus</i>	1993	Alemanha
HUN1	AB701719	<i>Alliaria petiolata</i>	1996	Hungria
DNK3	AB701703	<i>Brassica rapa</i>	1978	Dinamarca
DEU1	AB701699	-	1976	Alemanha

4.11 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS VIRAIS

As amostras foliares de cada isolado viral foram cortadas em pequenos pedaços e desidratadas em placas de Petri contendo 1,6 g de cloreto de cálcio para cada grama de folha fresca, e mantidos a uma temperatura de -20°C durante três meses. Após esse período, o material desidratado foi transferido para tubos, que continham cloreto de cálcio. Os tubos, devidamente identificados, foram armazenados a -20°C. As amostras infectadas com TuMV, CoLV e CaMV foram depositadas na coleção de vírus de plantas do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico.

4.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Preparações em contrastação negativa (*leaf-dip*) para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) foram obtidas para os extratos foliares e para as preparações semipurificadas de TuMV. Uma alíquota (de aproximadamente 50 μL) de cada preparação semipurificada foi colocada durante 10 minutos em contato com uma tela de cobre previamente preparada com filme de suporte reforçado com carbono. Em seguida, a tela de cobre foi submetida à secagem por capilaridade com o auxílio de papel filtro e submetida à lavagem (3x) com água destilada, sendo novamente seca em papel filtro. Após esse processo, a tela sensibilizada foi transferida para uma gota de acetato de uranila (2%) por 10 minutos, sendo realizada nova secagem em papel de filtro. Finalmente, a tela foi mantida a temperatura ambiente durante aproximadamente uma hora para ser então observada ao MET (KITAJIMA, 1965).

5 RESULTADOS

5.1 LEVANTAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS VIRAIS

Após realização de testes sorológicos e/ou moleculares para a identificação da presença de isolados de TuMV, CoLV e CaMV, constatou-se que das 109 amostras coletadas, 41 (37,61%) estavam infectadas somente com o **TuMV**, 4 (3,66%) somente com **CoLV** e 5 (4,58%) somente com **CaMV**. Além disso, observou-se a ocorrência de co-infecções entre: (i) **TuMV+CaMV** (1,83%) nas amostras T92, infectando nabiça (*Raphanus raphanistrum*) proveniente do município de Tinguá (CE), e T106, infectando couve-chinesa (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) proveniente de Pinhais (PR); (ii) **TuMV+CoLV** (1,83%) nas amostras T04, infectando couve (*B. oleraceae* var. *acephala*) provenientes do município de Socorro (SP) e T06, infectando raiz-forte (*Amoracia rusticana*) proveniente de Divinolândia (SP); (iii) **CoLV+CaMV** (5,50%) nas amostras T25, T36, T62, T63, T89 e T107, sendo cinco provenientes de municípios do Estado de São Paulo e somente uma (T107) proveniente do município de Pinhais (PR). Além dessas co-infecções duplas, identificou-se, na amostra 110, de couve proveniente do município de Pirenópolis (GO), infecção tripla: **TuMV+CoLV+CaMV**. As outras 48 amostras (44,03%), não estavam infectadas com nenhum dos três vírus (Tabela 10).

Tabela 10 -Levantamento e identificação molecular de isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV), cole latent virus (CoLV) e cauliflower mosaic virus (CaMV): código das amostras, hospedeiras, locais de coleta e os resultados obtidos por PCR

Código	Hospedeira – nome científico (nome comum)	Local de coleta (município/Estado)	RT-PCR		PCR	
			TuMV		CoLV	CaMV
			CI	CP	CP	ORF 1
T01	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (couve-flor)	Monte Alegre do Sul (SP)	+	-	-	-
T03	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (couve-flor)	Ibiúna (SP)	+	+	-	-
T04	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Socorro (SP)	+	+	+	-
T05	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Socorro (SP)	+	+	-	-
T06	<i>Armoracia rusticana</i> (raiz-forte)	Divinolândia (SP)	+	+	+	-
T07	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Iperó (SP)	+	+	-	-
T08	<i>A. rusticana</i> (raiz-forte)	Divinolândia (SP)	-	-	-	-
T09	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Monte Alegre do Sul (SP)	-	-	+	-
T10	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Divinolândia (SP)	+	+	-	-
T11	<i>A. rusticana</i> (raiz-forte)	Divinolândia (SP)	-	-	-	-
T12	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Divinolândia (SP)	-	-	-	-
T13	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Iperó (SP)	-	-	-	-
T14	<i>B. oleracea</i> (couve-flor)	Monte Alegre do Sul (SP)	-	-	-	-
T15	<i>B. oleracea</i> (couve)	Brasília (DF)	-	-	+	-
T16	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (couve-flor)	Socorro (SP)	-	-	-	-
T17	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Socorro (SP)	-	-	-	-
T18	<i>Raphanus</i> ssp. (nabo forrageiro)	Passo Fundo (RS)	+	+	-	-
T19	<i>B. napus</i> (canola)	Curitiba (PR)	-	-	-	-
T20	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Curitiba (PR)	+	-	-	-
T21	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Munhoz (MG)	+	+	-	-
T22	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Munhoz (MG)	+	+	-	-
T23	<i>B. rapa</i> (mostarda)	Munhoz (MG)	+	+	-	-
T24	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Bragança Paulista (SP)	+	+	-	-
T25	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Divinolândia (SP)	-	-	+	+
T26	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Divinolândia (SP)	+	+	-	-
T27	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	São José do Rio Pardo	+	+	-	-
T28	<i>Cichorium intybus intybus</i> (almeirão)	São José do Rio Pardo	-	-	-	-
T29	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Divinolândia (SP)	-	-	-	-
T30	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Holambra (SP)	-	-	-	-
T31	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Sto. Antônio do Pinhal	+	+	-	-
T32	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Sto. Antônio do Pinhal	-	-	-	+
T33	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Sto. Antônio do Pinhal	+	+	-	-
T34	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Sto. Antônio do Pinhal	+	+	-	-
T35	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Sto. Antônio do Pinhal	-	-	-	+
T36	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Sto. Antônio do Pinhal	-	-	+	+
T37	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Sto. Antônio do Pinhal	-	-	-	+
T40	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Ponta Grossa (PR)	-	-	-	-
T41	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Ponta Grossa (PR)	-	-	-	-
T42	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Ponta Grossa (PR)	-	-	-	-
T43	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Ponta Grossa (PR)	-	-	-	-
T44	<i>B. rapa</i> (canola)	Ponta Grossa (PR)	-	-	-	-
T45	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T46	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T47	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T48	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T49	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Biritiba Mirim (SP)	-	-	-	-
T50	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim (SP)	-	-	-	-
T51	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T52	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim (SP)	-	-	-	-
T53	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T54	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T55	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim (SP)	-	-	-	-

Tabela 10 (continuação)

T56	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T57	<i>R. sativus</i> (rabanete)	Biritiba Mirim (SP)	+	+	-	-
T58	<i>B. carinata</i> (mostarda-da-Indonésia)	Mogi das Cruzes (SP)	-	-	-	-
T59	<i>B. carinata</i> (mostarda-da-Indonésia)	Mogi das Cruzes (SP)	-	-	-	-
T60	<i>B. rapa</i> (pak-choi)	Mogi das Cruzes (SP)	+	+	-	-
T61	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Mogi das Cruzes (SP)	+	+	-	-
T62	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Pindamonhangaba (SP)	-	-	+	+
T63	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Pindamonhangaba (SP)	-	-	+	+
T64	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Pindamonhangaba (SP)	-	-	+	-
T65	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Mogi das Cruzes (SP)	+	+	-	-
T66	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Passo Fundo (RS)	-	-	-	-
T67	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Sta. Isabel (PA)	-	-	-	-
T68	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Sta. Isabel (PA)	-	-	-	-
T69	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Sta. Isabel (PA)	-	-	-	-
T70	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Sta. Isabel (PA)	+	+	-	-
T71	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Piedade (SP)	-	-	-	-
T72	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Piedade (SP)	-	-	-	-
T73	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Piedade (SP)	-	-	-	-
T74	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Piedade (SP)	-	-	-	-
T75	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Piedade (SP)	-	-	-	-
T76	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Sorocaba (SP)	-	-	-	-
T77	<i>B. rapa</i> (mostarda)	Sorocaba (SP)	-	-	-	-
T78	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Sto Antônio da Posse (SP)	+	+	-	-
T79	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Araucária (PR)	-	-	-	-
T80	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Araucária (PR)	+	-	-	-
T81	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Araucária (PR)	+	+	-	-
T82	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Araucária (PR)	+	+	-	-
T83	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Araucária (PR)	-	-	-	-
T84	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Araucária (PR)	+	+	-	-
T85	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Araucária (PR)	+	-	-	-
T86	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Araucária (PR)	-	-	-	-
T87	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Araucária (PR)	+	+	-	-
T88	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Araucária (PR)	-	-	-	+
T89	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Ubatuba (SP)	-	-	+	+
T90	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Arapiraca (AL)	-	-	+	-
T91	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Gralha Azul (PR)	+	+	-	-
T92	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Tinguá (CE)	+	+	-	+
T93	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Tinguá (CE)	+	+	-	-
T94	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Tinguá (CE)	-	-	-	-
T95	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Ibiúna (SP)	-	-	-	-
T96	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Ibiúna (SP)	+	+	-	-
T97	<i>B. oleraceae</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Ibiúna (SP)	-	-	-	-
T98	<i>Galinsoga parviflora</i> (picão-branco)	Ibiúna (SP)	-	-	-	-
T99	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Ibiúna (SP)	-	-	-	-
T100	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Ibiúna (SP)	-	-	-	-
T101	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Ibiúna (SP)	+	+	-	-
T102	<i>B. oleraceae</i> var. <i>botrytis</i> (couve-flor)	Ibiúna (SP)	-	-	-	-
T103	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	Ibiúna (SP)	+	+	-	-
T104	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Ibiúna (SP)	+	+	-	-
T105	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> (couve-rábano)	SI	-	-	-	-
T106	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Pinhais (PR)	+	+	-	+
T107	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Pinhais (PR)	-	-	+	+
T108	<i>Nasturtium officinale</i> (agrião)	SI	-	-	-	-
T109	<i>R. raphanistrum</i> (nabiça)	Pirenópolis (GO)	-	-	-	+
T110	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Pirenópolis (GO)	+	+	+	+
T111	<i>B. oleraceae</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Nova Odessa (SP)	-	-	-	+
T112	<i>B. oleraceae</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Mâncio Lima (AC)	-	-	-	-

Legenda: (+) resultados positivos; (-) resultados negativos; CI – inclusão cilíndrica; CP – capa proteica; (SI) amostra sem identificação de procedência; ORF 1 do CaMV codifica para a proteína de movimento do vírus

5.2 ANÁLISES BIOLÓGICAS: GAMA DE HOSPEDEIRO E PATOTIPAGEM

Foram selecionados treze isolados de TuMV (T03, T06, T21, T22, T24, T26, T31, T34, T48, T57, T60, T61 e T81) para serem caracterizados por meio do desafio de linhagens de *Brassica napus*, via inoculação mecânica, com o objetivo de classificar os isolados em patotipos de acordo com a proposta de Jenner e Walsh (1996). Dos treze isolados submetidos ao teste de patotipagem, 76,92% foram provenientes do Estado de São Paulo, 15,38% do Estado de Minas Gerais e 7,69% do Estado do Paraná. Com relação às hospedeiras, 53,84% foram isolados de espécies cultivadas dos gêneros *Raphanus* e *Brassica*, e os outros 46,16% foram isolados de espécies de plantas da vegetação espontânea pertencentes ao gênero *Raphanus*.

Constatou-se que independentemente da origem geográfica, espécie do hospedeiro, tipo de sintoma induzido e ano de coleta da amostra, o patotipo 1 foi predominante nas áreas produtoras de brássicas, nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Os isolados classificados como patotipo 1, geralmente, induzem sintomas de mosaico sistêmico na linhagem S6 de *B. napus* (susceptível, não possui genes de resistência), necrose sistêmica na linhagem 22S (possui o gene de resistência dominante *TuRB03*), além de não infectar as linhagens R4 (possui o gene de resistência dominante *TuRB01*) e 165 (que possui os genes de resistência dominantes *TuRB04* e *TuRB05*) (Figura 27, Tabela 11).

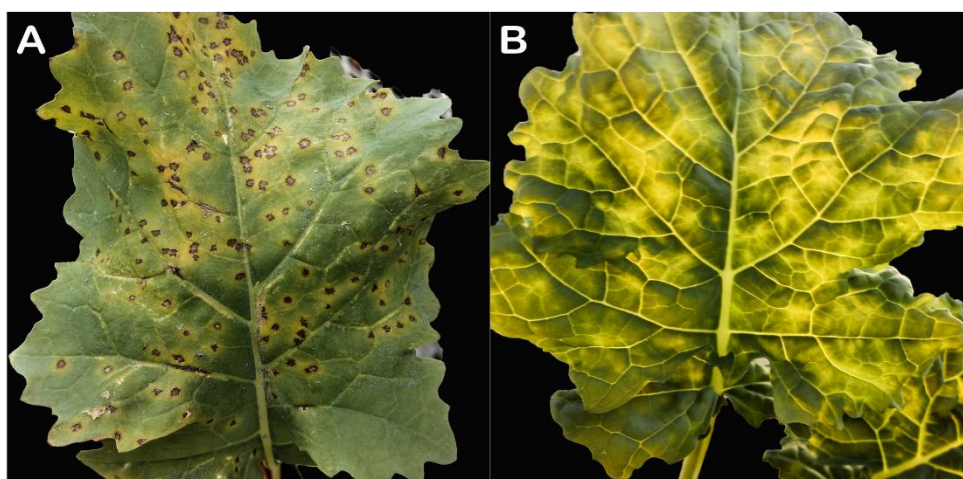


Figura 27 - Sintomas induzidos por isolados de turnip mosaic virus (TuMV) em linhagens diferenciadoras de *Brassica napus* utilizadas em experimentos de patotipagem. (A) sintoma de necrose sistêmica (+N) induzido na linhagem 22S pelo isolado T48; e (B) sintoma de mosaico sistêmico (+) induzido na linhagem S6 pelo isolado T06. (FONTE: O autor)

Tabela 11 - Resultado da patotipagem dos treze isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) quando inoculados mecanicamente em linhagens diferenciadoras de *Brassica napus*

Linhagens/genes de resistência						
Isolados	S6/suceptível	R4/TuRB01	165/TuRB04 e 05	S1	22S/TuRB03	Patotipo
T03	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ _N (5/5)	1
T06	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ (5/5)	+ (5/5)	1
T21	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ _N (5/5)	1
T22	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ _N (5/5)	1
T24	+/O (3/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ (5/5)	+ _N (5/5)	1
T26	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ _N (5/5)	1
T31	+ (5/5)	+/ _N (5/5)	+/O (3/5)	NR	O (0/5)	3/4
	+/ _N (5/5)	O/ _{R_N} (3/5)	O (0/5)	+ (5/5)	O (0/5)	1
T34	+/ _N (3/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ (5/5)	O (0/5)	1
T48	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ _N (5/5)	1
T57	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ _N (5/5)	1
T60	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ (5/5)	+ _N (5/5)	1
T61	+ (5/5)	O (0/5)	O (0/5)	O (0/5)	+ _N (5/5)	1
T81	+/O (4/5)	O (0/5)	O (0/5)	+/O (3/5)	+ _N (5/5)	1

Apesar de a maioria dos isolados brasileiros de TuMV caracterizados neste trabalho ter sido classificada como patotipo 1, foi possível notar algumas peculiaridades entre eles. Em geral, isolados de TuMV classificados como patotipo 1 induzem mosaico (sistêmico) na linhagem S1 de *B. napus*. No entanto, os isolados T03, T21, T22, T26, T48, T57 e T61 não foram capazes de infectar essa linhagem. Já com relação à linhagem 22S, isolados do patotipo 1, normalmente, induzem sintomas de necrose sistêmica. Porém, o isolado T06 causou sintoma de mosaico sistêmico, enquanto que o isolado T34 não foi capaz de infectar essa linhagem. Além disso, o isolado T34 induziu dois diferentes tipos de sintomas na linhagem S6: necrose sistêmica e mosaico sistêmico. O sintoma de necrose sistêmica pode ser considerado atípico para essa linhagem, sendo o mosaico sistêmico mais comum de ser observado (Tabela 11). Esses resultados sugerem que esses isolados de TuMV possam ser variantes do patotipo 1.

Os resultados obtidos para o isolado T31 não foram conclusivos, mesmo após repetir as inoculações e avaliações diversas vezes nas linhagens diferenciadoras. Em dois dos testes realizados, os resultados foram idênticos: o isolado T31 induziu sintoma sistêmico na linhagem S6, mosaico sistêmico/necrose sistêmica na linhagem R4, mosaico sistêmico/ausência de infecção na linhagem 165, ausência de infecção na linhagem 22S e mosaico sistêmico na linhagem S1 sugerindo que esse isolado pudesse ser enquadrado como patotipo 3 e/ou patotipo 4. No entanto, quando as inoculações nas linhagens diferenciais de *B. napus* foram repetidas pela terceira vez, esse mesmo isolado induziu necrose sistêmica na linhagem S6, não foi capaz

de infectar sistemicamente, induzindo reação de hipersensibilidade (resistência) na linhagem R4, e não foi capaz de infectar as linhagens 165 e 22S, além de induzir sintoma sistêmico na linhagem S1 (Tabela 11). Com esses resultados, inconclusivos, pode-se inferir na possibilidade de co-infecção entre patótipos na mesma planta hospedeira, ou ainda no surgimento de um novo patótipo, diferente dos 12 patótipos conhecidos (Tabela 11).

Com o objetivo de se determinar a gama de hospedeiros, selecionaram-se cinco isolados de TuMV (T06, T22, T31, T48, T61) para serem inoculados mecanicamente em diversas espécies de plantas cultivadas e em espécies de plantas indicadoras e da vegetação espontânea. Vale lembrar que esses cinco isolados de TuMV também foram selecionados para sequenciamento completo de seus genomas, resultados que serão apresentados e discutidos mais adiante. Com relação à gama de hospedeiros (variedades comerciais), nenhum dos cinco isolados inoculados foi capaz de infectar repolho e couve-rábano. Já o T31 e o T48 foram capazes de infectar brócolis, induzindo sintomas de necrose sistêmica 25 dias após a inoculação. Além disso, os isolados T31 e T06 também foram capazes de infectar couve-flor, induzindo mosaico sistêmico 20 dias após as inoculações (Figura 28, Tabela 12).

Os cinco isolados foram capazes de infectar três variedades de *Brassica rapa* (mostarda-lisa, mostarda-crespa e mostarda-japonesa), induzindo sintomas sistêmicos 20 dias após as inoculações. Nas variedades lisa e japonesa, os cinco isolados induziram mosaico sistêmico. Já a variedade crespa se mostrou mais sensível à infecção por TuMV, expressando necrose local (folhas inoculadas) para T22 e T48, que evoluíram para necrose sistêmica e morte das plantas, 30 dias após as inoculações para os cinco isolados de TuMV avaliados (Figura 28 e Tabela 12).

Somente T31 e oT48 foram capazes de infectar couve-chinesa, induzindo sintomas de mosaico foliar, que evoluíram para necrose sistêmica (Figura 28 e Tabela 12). Vale ressaltar que T48 foi coletado em cultivos comerciais de couve-chinesa no município de Biritiba Mirim, causando sintomas severos nas plantas, que levaram a perdas superiores a 60% (RODRIGUES et al., 2015).

Os cinco isolados de TuMV foram capazes de infectar sistemicamente plantas de rúcula. Porém, T06 e T61 induziram apenas deformação foliar 20 dias após a inoculação, o que comprometeu o desenvolvimento das plantas. T22, T31 e T48 induziram pontos necróticos locais, entre 10 e 15 dias após as inoculações, que evoluíram para uma infecção sistêmica com deformação foliar. T31 induziu sintomas sistêmicos mais drásticos, que evoluíram de mosaico para necrose 20 dias após as inoculações (Figura 28 e Tabela 12).

Somente T48 e T61 foram capazes de infectar sistemicamente plantas de rabanete (*Raphanus sativus*), induzindo mosaico 20 dias após as inoculações (Figura 28 e Tabela 12). No caso das inoculações em goivo (*Mathiola incana*), somente o T48 foi capaz de infectar essa espécie sistemicamente. No entanto, as infecções transcorreram de forma latente, sem indução de sintomas. A presença do vírus foi confirmada por PTA-ELISA 30 dias após as inoculações. Em espinafre Nova Zelândia (*Tetragonia tetragonoides*), T22, T48 e T61 induziram anéis cloróticos locais nas folhas, observados 15 dias após as inoculações, que evoluíram para anéis cloróticos sistêmicos, observados 20 dias após as inoculações (Figura 28 e Tabela 12). As inoculações mecânicas de espécies de plantas pertencentes a outras famílias botânicas, incluindo espécies de interesse econômico como plantas ornamentais, apresentaram resultados negativos em PTA-ELISA, 30 dias após as inoculações, sendo consideradas imunes aos cinco isolados de TuMV avaliados.

Os cinco isolados de TuMV foram capazes de infectar plantas de nabiça (*Raphanus raphanistrum*), induzindo mosaico sistêmico (Figura 28 e Tabela 13). Porém, os sintomas em nabiça se expressaram mais tardiamente, 25 dias após a inoculação das plântulas.

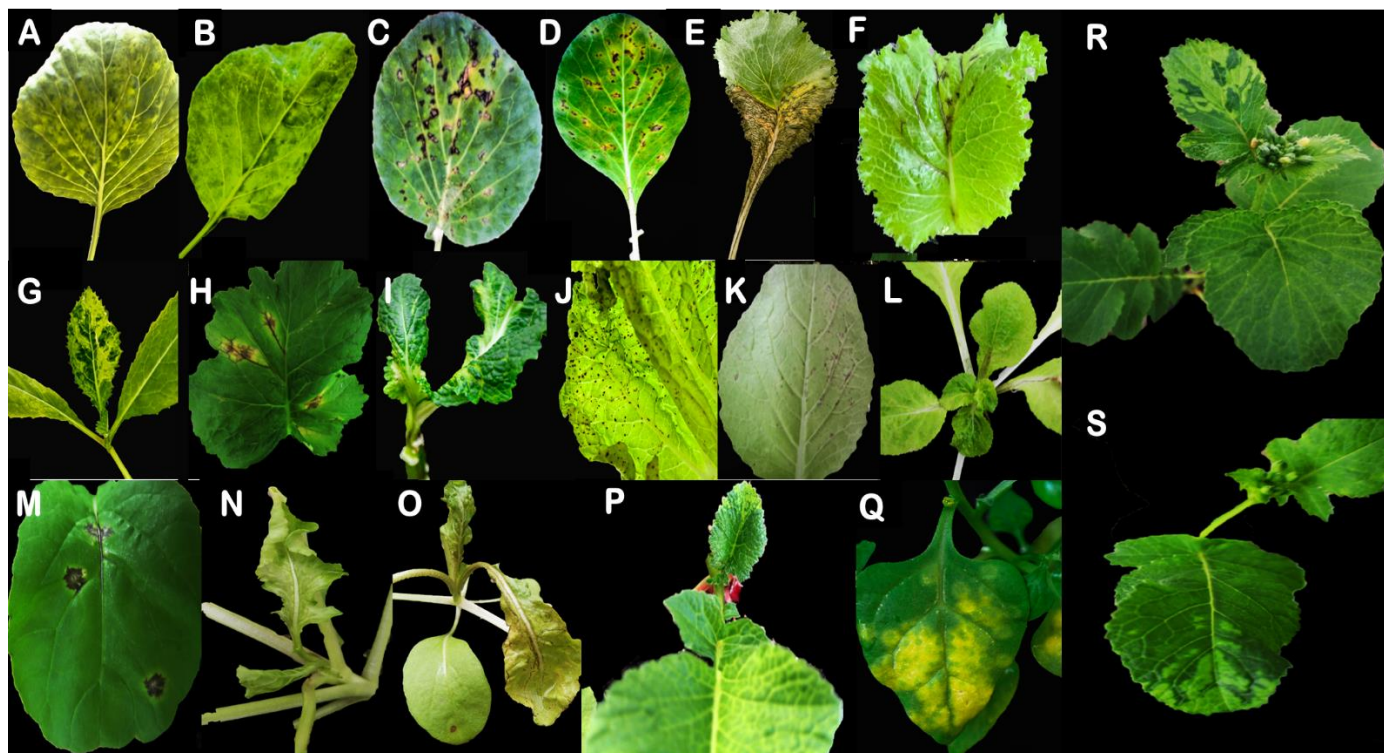


Figura 28 - Sintomas induzidos por isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) em variedades de *Brassica* e *Raphanus*. (A) sintoma de mosaico e deformação foliar em couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) induzido pelo isolado T06; (B) e (C) mosaico e necrose sistêmica em couve-flor e brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), respectivamente, induzidos pelo isolado T31; (D) folha jovem de brócolis com necrose sistêmica induzida pelo isolado T48; (E) e (F) necrose sistêmica em mostarda-crespa (*B. rapa*) induzida pelo isolado T31; (G) mosaico em mostarda-lisa induzido pelo isolado T61; (H) pontos necróticos locais em mostarda-crespa induzido pelo isolado T48; (I) mosaico e deformação foliar em mostarda-japonesa induzido pelo isolado T22; (J) necrose sistêmica em folha de couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *pekinensis*); (K) necrose induzida pelos isolados T31 e T48 em couve-chinesa; (L) mosaico e má formação da cabeça em couve-chinesa inoculada mecanicamente com o isolado T48; (M) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T22 em rúcula (*Eruca sativa*); (N e O) sintomas de mosaico, distorção foliar e mau desenvolvimento das plantas de rúcula induzidos pelo isolado T06; (P) mosaico sistêmico induzido pelo isolado T61 em rabanete (*Raphanus sativus*); (Q) anéis cloróticos sistêmicos induzidos pelo isolado T48 em espinafre Nova Zelândia (*Tetragonia tetragonoides*); (R) e (S) sintomas de mosaico induzidos pelos isolados T31 e T06, respectivamente, em nabiça (*Raphanus raphanistrum*). (FONTE: O autor)

Tabela 12 - Gama experimental de hospedeiros (espécies cultivadas de importância comercial) de cinco isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) caracterizados neste trabalho por meio de inoculações mecânicas

Espécies hospedeiras	Isolados brasileiros de TuMV				
	T06	T22	T31	T48	T61
AIZOACEAE					
<i>Tetragonia tetragonoides</i> (espinafre Nova Zelândia)	- (0/3)	PCL/+PCS (3/3)	- (0/3)	PCL/+PCS (3/3)	PCL/+PCS (3/3)
ASTERACEAE					
<i>Lactuca sativa</i> (alface lisa)	+CL (3/3)	+CL (3/3)	+CL (3/3)	+CL (3/3)	+CL (3/3)
BRASSICACEAE					
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (couve-flor)	+M (2/5)	- (0/5)	+M (3/5)	- (0/5)	- (0/5)
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)
<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	- (0/5)	- (0/5)	+N (3/5)	+N (2/5)	- (0/5)
<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> (couve-rabano)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
<i>B. rapa</i> (mostarda-crespa)	+N/DF/† (4/4)	PNL/+N/DF/† (4/4)	+N/DF/† (4/4)	PNL/+N/DF/† (4/4)	+N/DF/† (4/4)
<i>B. rapa</i> (mostarda-japonesa)	+M/DF (4/4)	+M/DF (4/4)	+M (4/4)	+M/DF/† (4/4)	+M (4/4)
<i>B. rapa</i> (mostarda-lisa)	+M/DF (6/6)	+M/DF (6/6)	+M/DF (6/6)	+M/DF (6/6)	+M/DF (6/6)
<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	- (0/5)	- (0/5)	+M/N (5/5)	+M/N (5/5)	- (0/5)
<i>Eruca sativa</i> (rúcula)	+DF (5/5)	PNL/+DF (5/5)	PNL/+DF/N/† (5/5)	PNL/+DF (5/5)	+DF (5/5)
<i>Raphanus sativus</i> (rabanete)	- (0/5)	N.A.	- (0/5)	+M (5/5)	+M (5/5)
<i>Mathiola incana</i> (goivo)	- (4/0)	- (4/0)	- (4/0)	L (4/2)	- (4/0)
CUCURBITACEAE					
<i>Cucurbita pepo</i> (abobrinha)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
FABACEAE					
<i>Cajanus cajan</i> (feijão-guandu)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
<i>Pisum sativum</i> (ervilha)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
ORCHIDACEAE					
<i>Phalaenopsis</i> (orquídea borboleta)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)
POACEAE					
<i>Avena sativa</i> (aveia)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
<i>Zea mays</i> (milho)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
SOLANACEAE					
<i>Capsicum annuum</i> (pimentão)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
<i>Solanum melongena</i> (berinjela)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)

Legendas: (-) = não infecta, (PCL) = pontos cloróticos locais, (+) = sintoma sistêmico, (DF) = deformação foliar, (M) = mosaico, (N) = necrose, (PNL) = pontos necróticos locais, (†) = morte da planta; (PCS) = pontos cloróticos sistêmicos, (NA) = não avaliado, (CL) = clareamento de nervuras, (L) = latência.

*Descrição dos sintomas em negrito indicam as diferenças de sintomas entre isolados/hospedeiras.

Tabela 13 - Gama experimental de hospedeiros da vegetação espontânea e espécies indicadoras dos cinco isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) caracterizados neste trabalho por meio de inoculações mecânicas

Espécies de plantas	Isolados de TuMV				
	T06	T22	T31	T48	T61
AMARANTHACEAE					
<i>Gomphrena globosa</i>	PNL (1/2)	PNL (1/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)
ASTERACEAE					
<i>Bidens pilosa</i> (picão-preto)	N.A.	N.A.	-(0/5)	-(0/5)	-(0/5)
BRASSICACEAE					
<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	+M (4/7)	+M (5/7)	+M (6/7)	+M (4/7)	+M (5/7)
CHENOPODIACEAE					
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)
COMMELINACEAE					
<i>Commelina</i> sp.	N.A.	N.A.	-(5/0)	-(5/0)	-(5/0)
SOLANACEAE					
<i>Datura stramonium</i> (trombeteira)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	+M/DF/† (2/2)	+M (2/2)	+M/DF/† (2/2)	+M/DF/† (2/2)	+M/DF/† (2/2)
<i>N. debneyi</i>	- (0/2)	- (0/2)	PNL (2/2)	- (0/2)	- (0/2)
<i>N. glutinosa</i>	PNL (2/2)	- (0/2)	+N (2/2)	PCL (2/2)	- (0/2)
<i>N. megalosiphom</i>	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)
<i>N. tabacum</i> Samsun NN	PNL (2/2)	- (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)
<i>N. tabacum</i> White Burley	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)
<i>N. tabacum</i> Xanthi	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	- (0/2)
<i>N. sylvestris</i>	PNL (2/2)	- (0/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)	PNL (2/2)
<i>Physalis floridana</i> (físalis)	+M (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)
<i>Solanum americanum</i> (maria-pretinha)	N.A.	N.A.	-(0/5)	-(0/5)	-(0/5)

Legendas: (-) = não infecta, (PCL) = pontos cloróticos locais, (+) = sintoma sistêmico, (DF) = deformação foliar, (M) = mosaico, (N) = necrose, (PNL) = pontos necróticos locais, (†) = morte da planta; (PCS) = pontos cloróticos sistêmicos, (NA) = não avaliado, (CL) = clareamento de nervuras, (L) = latência.

*Descrição dos sintomas em negrito indicam as diferenças de sintomas entre isolados/hospedeiras.

Plântulas das espécies *Nicotiana tabacum* “Samsun NN”, *N. tabacum* “White Burley”, *N. sylvestris* e *N. tabacum* “Xanthi” reagiram com sintomas locais necróticos, quando inoculadas com cada um dos cinco isolados de TuMV (Figura 29 e Tabela 13), sendo que os sintomas surgiram em até 15 dias após as inoculações. *N. benthamiana* comportou-se como altamente susceptível a todos os isolados brasileiros de TuMV, desenvolvendo sintomas de mosaico e deformação foliar, que surgiram sete dias após as inoculações, findando com a morte das plantas 20 dias após as inoculações, exceto para T22, que não causou a morte das plantas inoculadas. No caso de *N. glutinosa*, não houve indução de sintomas quando as plantas foram desafiadas com T22 e T61. Pontos necróticos e cloróticos locais foram induzidos pelos isolados T06 e T48, respectivamente, 20 dias após as inoculações. Já T31 induziu necrose sistêmica 25

dias após as inoculações (Figura 29 e Tabela 13). Em plantas de *N. megalosiphum* os isolados brasileiros de TuMV analisados não induziram sintomas e o vírus não foi detectado por DAS-ELISA. As espécies *Chenopodium amaranticolor* e *Gomphrena globosa* exibiram somente sintomas locais cloróticos que evoluíram para necróticos, quando inoculadas com os isolados testados, sendo que os sintomas surgiram 15 dias após as inoculações (Figura 29 e Tabela 13).

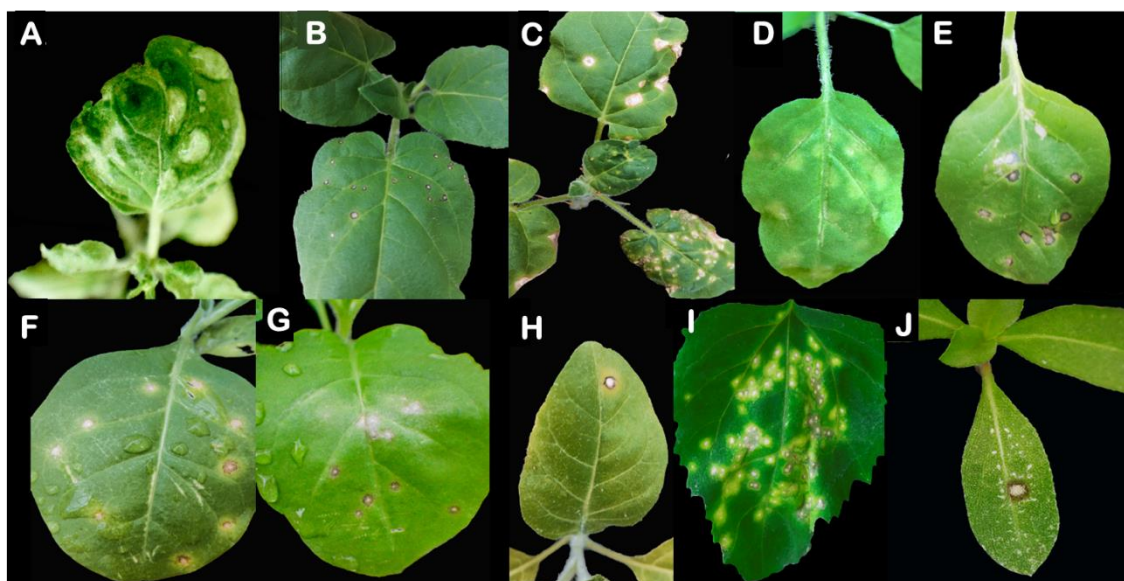


Figura 29 - Sintomas induzidos por isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) em diferentes espécies de plantas indicadoras. (A) mosaico sistêmico e deformação foliar induzido pelo isolado T06 em *Nicotiana benthamiana*; (B) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T06 em *N. glutinosa*; (C) necrose sistêmica induzida pelo isolado T31 em *N. glutinosa*; (D) pontos cloróticos locais induzidos pelo isolado T48 em *N. glutinosa*; (E) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T48 em *N. tabacum* Samsun NN; (F) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T22 em *N. tabacum* White Burley; (G) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T31 em *N. sylvestris*; (H) ponto necrótico local induzido pelo isolado T48 em *N. tabacum* Xanthi; (I) pontos necróticos locais induzidos pelo isolado T31 em *Chenopodium amaranticolor*; e ponto necrótico induzido pelo isolado T48 em *Gomphrena globosa*. (FONTE: O autor)

5.3 TRANSMISSÃO POR AFÍDEOS

Como não se conhece o papel das diferentes espécies de afídeos na dispersão e epidemiologia da virose causada pelo TuMV, com o objetivo de simular as eficiências de transmissão primária, foram utilizadas três espécies de afídeos: *Myzus persicae* (polífago/generalista), *Aphis fabae* (polífago/generalista) e *Brevicoryne brassicae* (monófago/especialista) em testes de transmissão experimental de um isolado de TuMV (T31), empregando um único afídeo por planta. As transmissões foram feitas a partir de períodos de

acesso à aquisição (PAA) em plantas de mostarda (espécie cultivada) e subsequentes períodos de acesso à inoculação (PAI) para plantas de nabiça (espécie da vegetação espontânea) e vice-versa, além de transmissões de mostarda para mostarda e de nabiça para nabiça.

Nas transmissões de TuMV envolvendo *M. persicae*, observou-se eficiência de transmissão de 19% na rota nabiça para mostarda, seguida de 14,3% de mostarda para nabiça, 9,5% de mostarda para mostarda e 4,8% de nabiça para nabiça (Figura 30 e Anexo A). Nas análises de blocos inteiramente casualizados, utilizando *Tukey* a 0,1%, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Para a espécie *A. fabae*, observou-se eficiência de transmissão de 23,80% de mostarda para mostarda, seguida de 9,52% de mostarda para nabiça e 4,76% de nabiça para nabiça de 4,76%. Quando se avaliou a eficiência de transmissão de nabiça para mostarda, os resultados foram nulos, ou seja, não houve transmissão. Porém, assim como observado para os testes de transmissão envolvendo *M. persicae*, não houve diferença estatística entre os tratamentos nos testes de transmissão com *A. fabae* (Figura 30 e Anexo B). Nos testes de transmissão envolvendo *B. brassicae*, com um único afídeo por planta, observou-se, apesar de bastante baixa, eficiência na transmissão de 9,52% de mostarda para nabiça, seguida de 4,76% de nabiça para mostarda e nabiça para nabiça. Curiosamente, *B. brassicae* não foi capaz de transmitir o isolado de TuMV de mostarda para mostarda. Não houve, porém, diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 30 e Anexo C). Vale destacar os elevados coeficientes de variação (CV) obtido nessas análises.

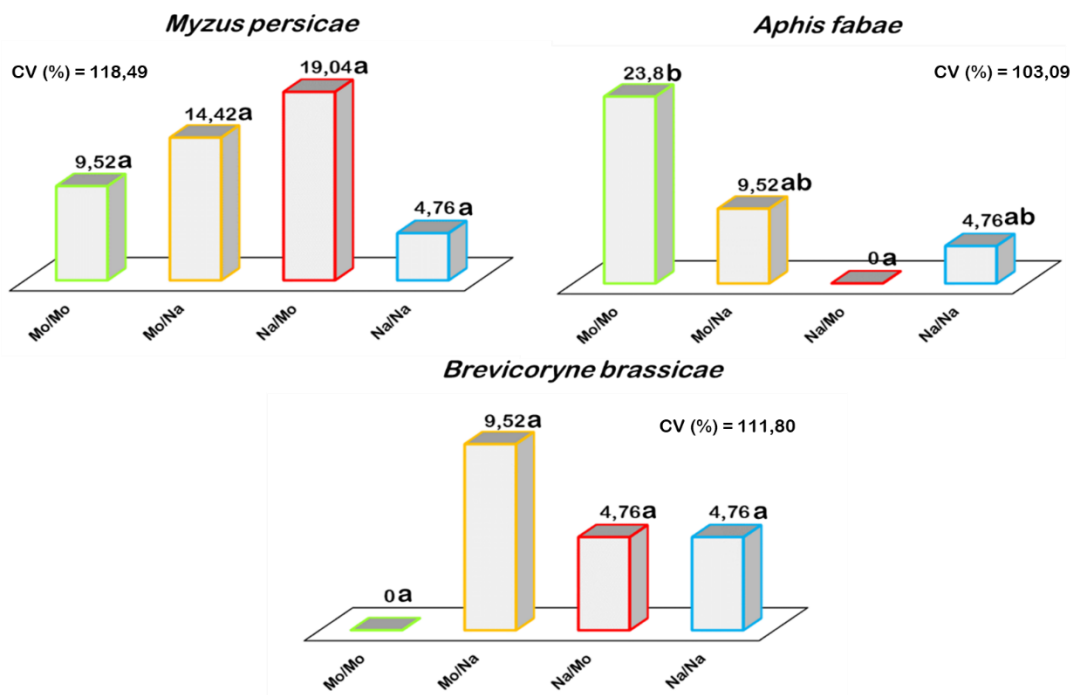


Figura 30 - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) utilizando um único afídeo por planta, em testes de transmissão empregando *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae*. (Mo/Mo): transmissão de mostarda para mostarda; (Mo/Na) de mostarda para nabiça; (Na/Mo) de nabiça para mostarda; e (Na/Na) de nabiça para nabiça. As análises estatísticas foram realizadas utilizando blocos inteiramente casualizados, com teste de *Tukey* a 0,1%. Letras iguais indicam que não há diferença entre tratamentos e letras diferentes indicam que há diferença estatística entre tratamentos. (CV) coeficiente de variação.

Nas análises de eficiência de transmissão por *B. brassicae*, comparando o número de afídeos (um e cinco afídeos) por planta, observou-se uma maior eficiência, com diferença estatística, quando se utilizaram cinco afídeos por planta (22,62%) quando comparado com os tratamentos envolvendo um único afídeo por planta, em que a transmissão não ocorreu (Figura 31 e Anexo F). Quando se comparou a eficiência de transmissão por *M. persicae*, empregando um e cinco afídeos por planta, observou-se uma eficiência significativamente maior de transmissão (42,83%) quando se utilizaram cinco afídeos, enquanto a eficiência de transmissão de um afídeo por planta foi de 9,52%, (Figura 31 e Anexo D). Neste caso, a eficiência de transmissão do TuMV por *M. persicae*, utilizando cinco afídeos por planta, foi 4,5 vezes maior que a eficiência de transmissão do TuMV por um único afídeo. Nas análises de eficiência de transmissão do TuMV por *A. fabae*, observou-se uma eficiência de 61,90% quando utilizando cinco afídeos por planta, 2,6 vezes maior do que a eficiência de transmissão observada quando se utilizou um único afídeo por planta (23,80%). No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 31 e Anexo E).

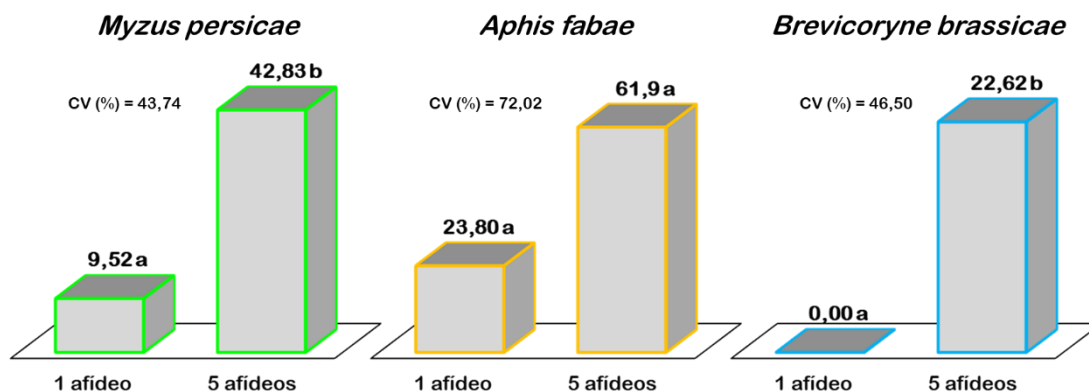


Figura 31 - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) de mostarda para mostarda (Mo/Mo), em testes experimentais, empregando *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae*, em tratamentos com um ou cinco afídeos por planta. As análises estatísticas foram realizadas utilizando blocos inteiramente casualizados, com teste de Tukey a 0,1%. Letras iguais indicam que não há diferença entre tratamentos e letras diferentes indicam que há diferença estatística entre tratamentos. (CV) coeficiente de variação.

Quando se comparou a eficiência de transmissão das três espécies de afídeos para cada tratamento, verificou-se que na transmissão de mostarda para mostarda (com um único afídeo por planta), *A. fabae* foi a mais eficiente na transmissão (23,8%), seguida de *M. persicae* (9,52%) e *B. brassicae* (nula). Porém, só houve diferença estatística entre as espécies *A. fabae* e *B. brassicae* (Figura 32 e Anexo G). As análises revelaram que não houve diferença estatística (Tukey a 0,1%) entre as três espécies de afídeos quando estas foram submetidas à PAA e PAI, respectivamente, de mostarda para nabiça, nabiça para mostarda e nabiça para nabiça (Figura 32 e Anexo H). Nos testes de transmissão de mostarda para nabiça, as taxas de transmissão foram de 14,42% para *M. persicae* seguida de 9,52% para *A. fabae* e *B. brassicae*, porém também não houve diferença estatística entre os tratamentos (Figura 32 e Anexo I). Nos testes de transmissão de nabiça para mostarda, *M. persicae* apresentou uma eficiência de transmissão de 19,04%, seguida de 4,76% para *B. brassicae* e *A. fabae* (nula). Apesar da ineficiência da transmissão de *A. fabae* não houve diferença estatística na taxa de transmissão entre as três espécies de afídeos (Figura 32 e Anexo I). Os testes de transmissão utilizando um único afídeo por planta, de nabiça para nabiça, revelaram que independente da espécie desafiada, a eficiência de transmissão foi a mesma (4,76%) (Figura 32 e Anexo J).

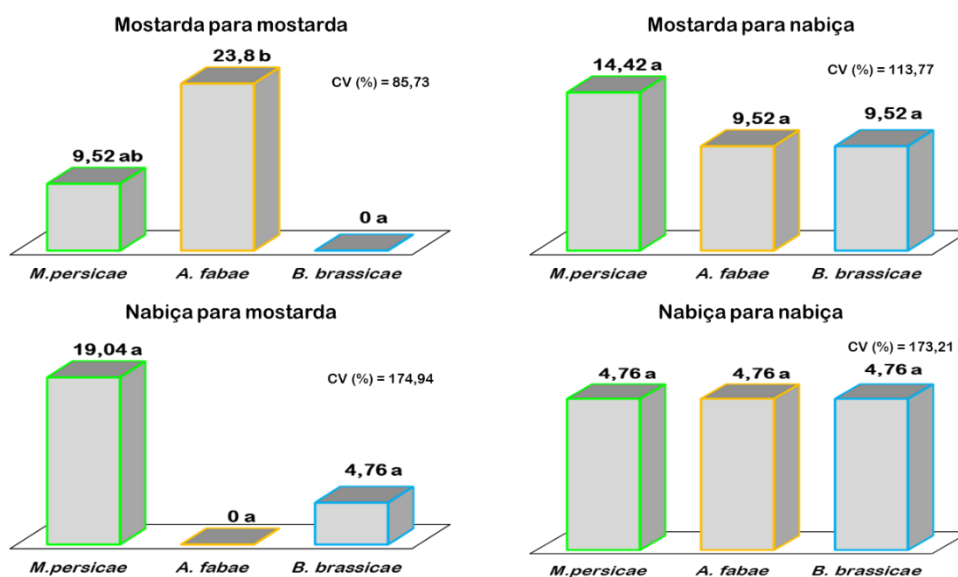


Figura 32 - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) em testes experimentais de transmissão empregando *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae*, utilizando um único indivíduo por planta, com aquisição do vírus em mostarda e nabiça para posterior transmissão para mostarda e nabiça. As análises estatísticas foram realizadas utilizando blocos inteiramente casualizados, com teste de Tukey a 0,1%. Letras iguais indicam que não há diferença entre tratamentos e letras diferentes indicam que há diferença estatística entre tratamentos. (CV) coeficiente de variação.

Quando se comparou a eficiência de transmissão das espécies de afídeos, utilizando cinco indivíduos por planta, observou-se uma eficiência de 61,90% para *A. fabae*, seguida de 42,82% para *M. persicae* e 22,62% para *B. brassicae*. Porém não houve diferença estatística entre os os tratamentos (Figura 33 e Anexo K).

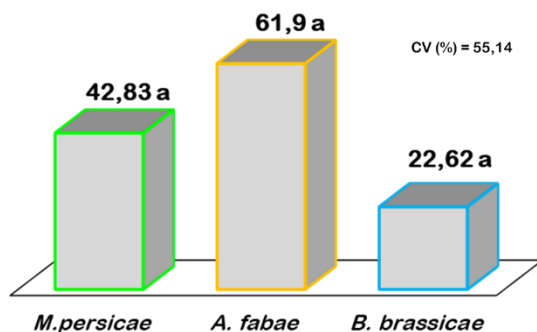


Figura 33 - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) em testes experimentais de transmissão empregando *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae*, utilizando cinco indivíduos por planta, com aquisição do vírus em mostarda e posterior transmissão também para mostarda. As análises estatísticas foram realizadas utilizando blocos inteiramente casualizados, com teste de Tukey a 0,1%. Letras iguais indicam que não há diferença entre tratamentos e letras diferentes indicam que há diferença estatística entre tratamentos. (CV) coeficiente de variação.

Com o intuito de simular a epidemiologia do TuMV em cultivos de brássicas, de acordo com os resultados obtidos nos testes experimentais de transmissão com as três espécies de afídeos estudadas, foi elaborado um modelo (Figura 34) para facilitar a compreensão dos componentes envolvidos e dos seus papéis na transmissão do vírus entre plantas cultivadas e espécies da vegetação espontânea. Observa-se que *A. fabae* (polífaga), embora não colonize brássicas, foi a espécie de afídeo com maior eficiência de transmissão do TuMV, seguida de *M. persicae* (polífaga) e *B. brassicae* (monófaga) (Figura 34). No modelo, foi incluída uma planta de alface, com o objetivo de chamar a atenção para a importância dessa hortaliça, que além de estar sempre associada aos cultivos de brássicas, é hospedeira do TuMV. Os aspectos da epidemiologia do TuMV nos cultivos de alface, no Brasil, ainda são desconhecidos. Em regiões de clima temperado, o TuMV é um patógeno importante nos cultivos de alface (esses aspectos serão discutidos mais adiante).

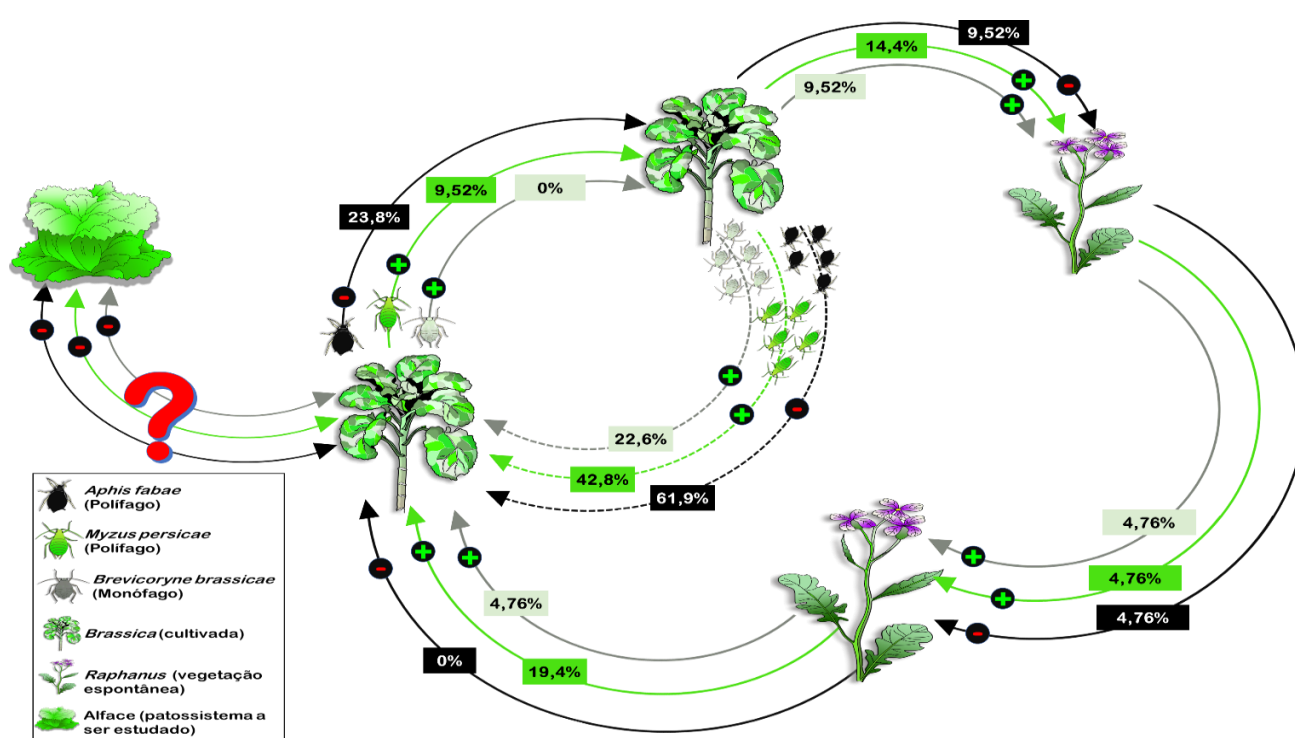


Figura 34 - Simulação da epidemiologia do turnip mosaic virus (TuMV) em um campo de cultivo de hortaliças, baseada nos resultados dos testes de transmissão experimental obtidos neste trabalho. As eficiências de transmissão das três espécies de afídeos estão indicadas nas linhas que fazem a ligação entre as plantas, sendo as linhas pretas para *Aphis fabae*, verdes para *Myzus persicae* e cinzas para o *Brevicoryne brassicae*: Brassica (cultivada)/Brassica (cultivada), Brassica (cultivada)/Raphanus (vegetação espontânea), Raphanus (vegetação espontânea)/Brassica (cultivada) e Raphanus (vegetação espontânea)/Raphanus (vegetação espontânea). (+) = afídeos que são capazes de colonizar brássicas; (-) = afídeos que não são capazes de colonizar brássicas. Linhas contínuas correspondem aos testes de transmissão empregando um único afídeo por planta e as linhas tracejadas correspondem aos testes de transmissão empregando cinco afídeos por planta. O ponto de interrogação em vermelho representa a possível interação entre os cultivos de brássicas e de alface, uma vez que o TuMV pode infectar esta hospedeira. (FONTE: O autor)

5.4 DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS BRASILEIROS DE TuMV: SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A diversidade genética dos 44 isolados brasileiros de TuMV foi avaliada por meio de extração de RNA de cada amostra coletada, RT-PCR, sequenciamento e análises de duas porções genômicas: a capa proteica (CP) completa [fragmento de DNA com 866 pares de bases (pb)], e outra correspondente à inclusão citoplásmica cilíndrica, CI, (fragmento de DNA com 605 pb – sequência parcial). Observou-se que as porcentagens de identidade de nucleotídeos entre os isolados variaram de 84% a 100%, enquanto que as identidades de aminoácidos deduzidos variaram de 88% a 100% para a CP (Figura 35). Para a região genômica correspondente à CI (parcial), as porcentagens de identidade de nucleotídeos variaram de 76% a 100%, enquanto que as porcentagens de identidade de aminoácidos deduzidos variaram de 84% a 100% (Figura 36). Observou-se que as porções genômicas correspondentes à CI (parcial) dos isolados brasileiros de TuMV foram mais variáveis quando comparadas com a CP.

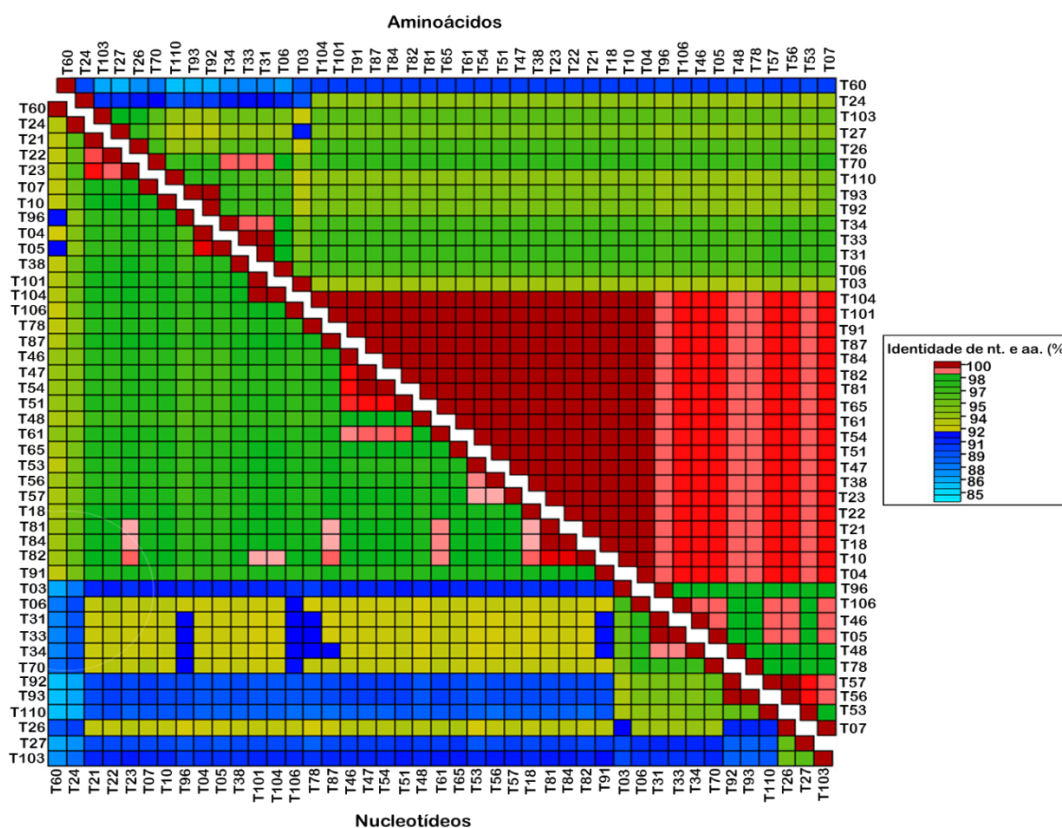


Figura 35 - Matriz de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos para a região genômica correspondente à capa proteica (CP) completa, entre os isolados de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho.

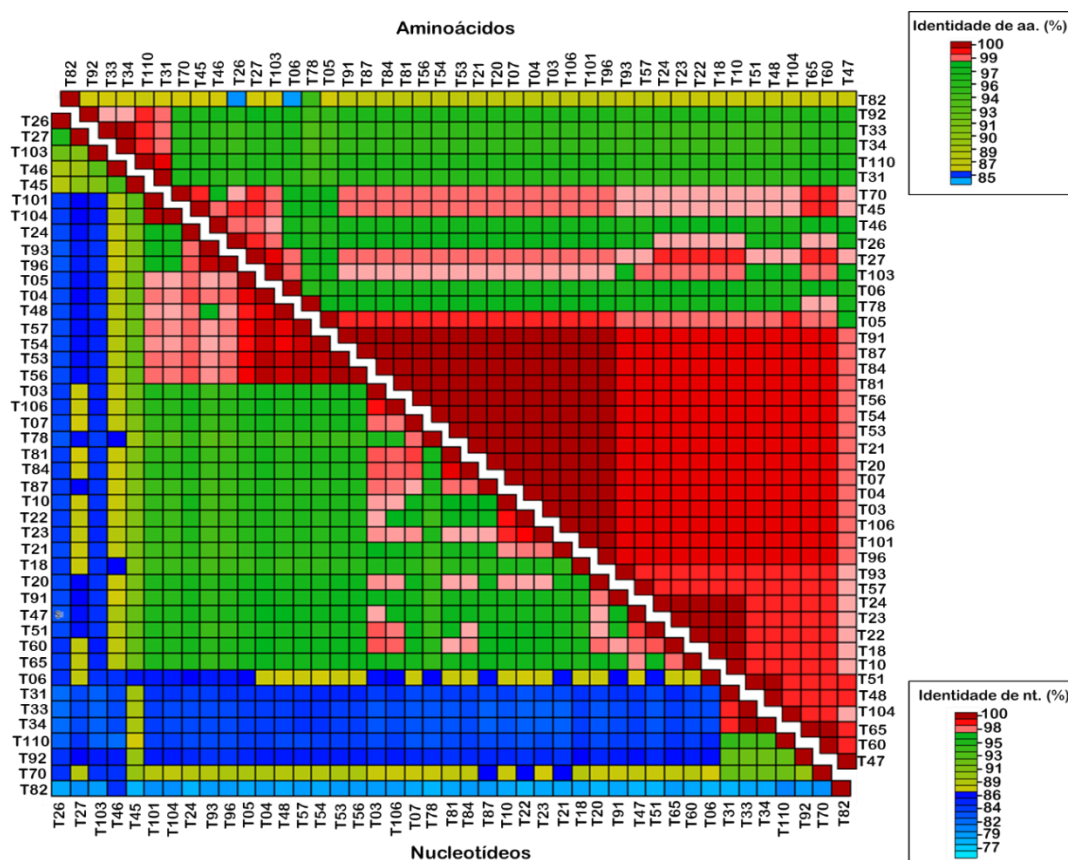


Figura 36 - Matriz de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos para a região genômica correspondente à inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) parcial, entre os isolados de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho.

As análises filogenéticas das porções genômicas correspondentes à CP e CI dos 44 isolados de TuMV sequenciados neste trabalho foram realizadas pelo método de máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) (Figura 37). Na árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das sequências completas de nucleotídeos da CP, houve a formação de cinco clados principais, sendo que os isolados brasileiros de TuMV se distribuíram em três diferentes grupos filogenéticos: “World B”, “Basal B” e “BR”. Os isolados de *Raphanus* tenderam a formar um grupo monofilético, inserido no clado “BR”. Esse grupamento monofilético também abrigou cinco isolados de *B. rapa* (T23, T47, T46, T48, T60), além de quatro isolados de *B. oleracea* (T04, T05, T10 e T104) (Figura 37A).

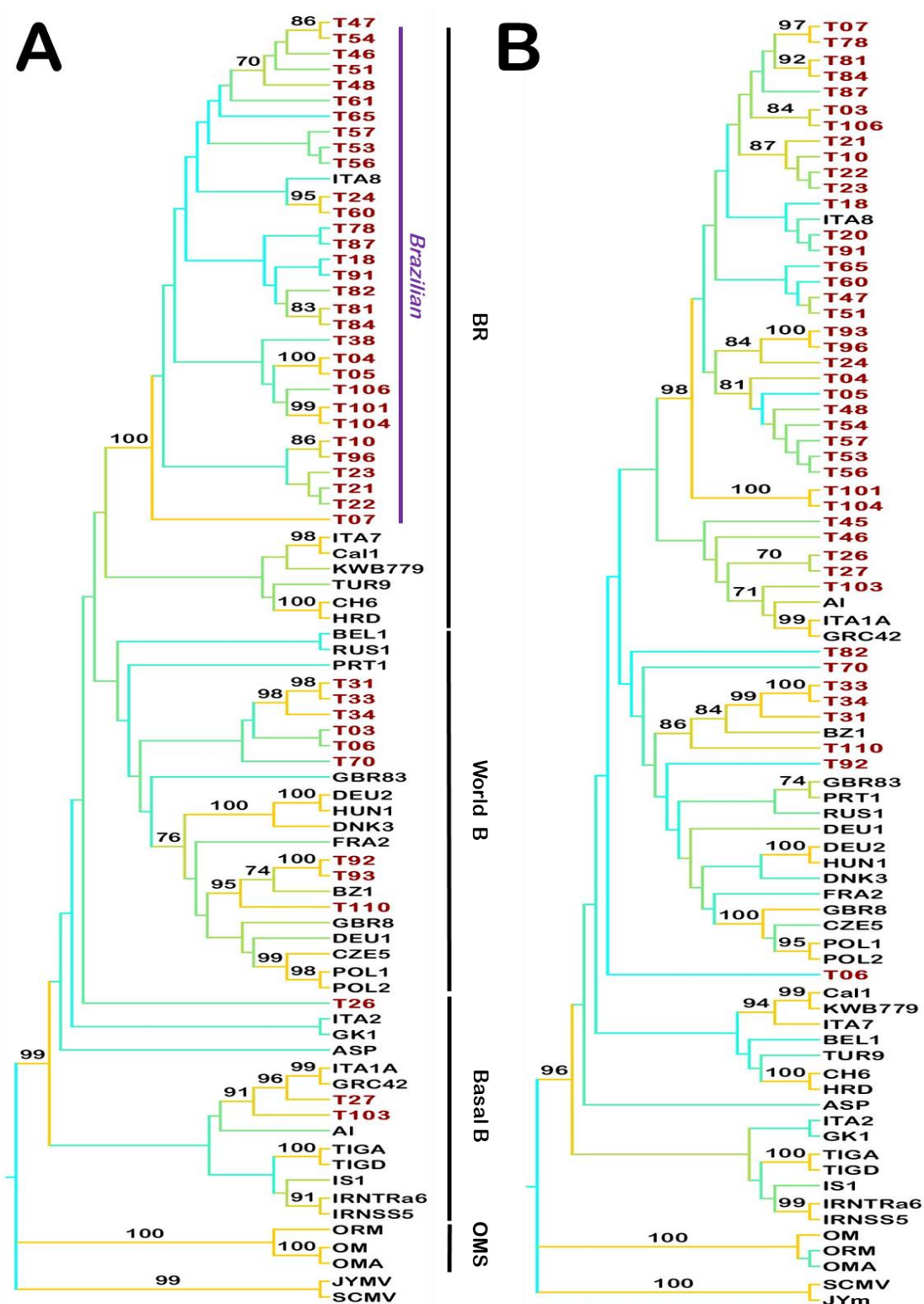


Figura 37 - Análises filogenéticas de máxima verossimilhança das sequências das porções genômicas da capa proteica, CP, completa (A) e inclusão citoplasmática cilíndrica, CI, parcial (B) dos isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho. Os grupos descritos ao lado direito da figura A, assim como os isolados utilizados para filogenia com os seus respectivos códigos de acesso no *Genbank* (Tabela 9, pag 90) foram propostos por Oshima et al. (2002). Em destaque (vermelho) estão os isolados brasileiros de TuMV sequenciados no presente trabalho. Um grupamento formado quase que exclusivamente por isolados brasileiros de TuMV pode ser observado na árvore da CP (à esquerda): *Brazilian group*. Os valores de *bootstrap* (para 1000 replicações) estão indicados acima dos ramos, sendo que tons verdes indicam valores mais baixos e tons alaranjados correspondem a valores mais elevados.

O grupamento filogenético “World B” abrigou nove isolados brasileiros, sendo seis deles de *B. oleracea* (T03, T31, T33, T34, T70 e T110), dois de *B. rapa* (T92 e T93) e um de *Amoracia rusticana* (T06) (Figura 37A). Os isolados brasileiros de *B. oleracea* tenderam a formar um grupo monofilético, com exceção do T110, que formou um segundo grupo monofilético composto pelos isolados de *B. rapa* com outro isolado brasileiro BZ1⁸ (Figura 37A). Porém, dois isolados brasileiros de *B. rapa*, T27 (proveniente de São José do Rio Pardo, SP) e T103 (Ibiúna, SP), agruparam-se com um isolado da Grécia (GRC42) e um da Itália (ITA1A) no grupo filogenético denominado de “Basal B” (Figura 37A).

As análises filogenéticas correspondentes à região genômica da CI pelo método de máxima verossimilhança, revelaram que os isolados brasileiros se agruparam em dois grandes grupos monofiléticos (Figura 37B). O primeiro grupo foi constituído, predominantemente, por isolados de *Raphanus* provenientes de diferentes municípios do Estado de São Paulo, juntamente com cinco isolados de *B. oleracea* (T3, T4, T5, T10 e T104), cinco de *B. rapa* (T23, T47, T48, T60 e T93), além dos isolados ITA8, AL, ITA1A e GRC41 (FIGURA 37B). No segundo grupo monofilético, observou-se uma tendência do agrupamento de isolados de *B. oleracea* (T31, T33, T34, T70 e T110), *Raphanus* (T82) e de *B. rapa* (T92). Apesar das diferenças entre as análises filogenéticas da CP e da CI, observou-se que em ambas as árvores filogenéticas não houve tendência de formação de grupos de isolados de acordo com a origem geográfica e/ou hospedeiro.

As análises das sequências de aminoácidos da CP revelaram que o motivo DAG (trinca de aminoácidos associada como a transmissão de potyvírus por afídeos) estava conservado em todos os isolados brasileiros de TuMV sequenciados. Nas análises de recombinação para região genômica correspondente à CP, dos 41 isolados sequenciados neste trabalho, observou-se que somente o isolado T60 (*B. rapa* – Mogi das Cruzes, SP) foi considerado recombinante (Anexo L). Essa recombinação ocorreu entre T34 (*Major parental*), proveniente de *B. oleracea* do município de Santo Antônio do Pinhal (SP) e T21 (*Minor parental*), proveniente de *R. raphanistrum* do município de Munhoz (MG). O fragmento derivado dessa recombinação apresentou 134 nucleotídeos. As análises de recombinação para a região genômica correspondente à CI revelaram que somente T82 (*R. raphanistrum*) foi recombinante. Neste caso, o evento de recombinação ocorreu entre T46 (*Major parental*), proveniente de *B. rapa* ssp. *pekinensis* do município de Biritiba Mirim (SP) com T93 (*Minor*

⁸ O isolado brasileiro BZ1 (AB093611) foi sequenciado por Oshima et al. (2002), porém não há qualquer informação sobre as características biológicas deste isolado, origem, local e data de coleta.

parental), também proveniente de *B. rapa* ssp. *pekinensis* do município de Tinguá (CE). A recombinação resultou em um fragmento de 414 nucleotídeos (Anexo L).

Entre os 41 isolados de TuMV identificados, foram selecionados cinco para sequenciamento genômico completo. Vale ressaltar que estes são os primeiros isolados brasileiros de TuMV a terem seus genomas totalmente sequenciados: T06 (raiz-forte – SP), T22 (nabiça – MG), T31 (brócolis – SP), T48 (couve-chinesa – SP) e T61 (nabiça – SP). Inicialmente, pensou-se em realizar as extrações de RNA a partir de preparações semipurificadas de cada isolado viral selecionado. No entanto, resultados satisfatórios foram obtidos somente para a preparação semipurificada do isolado T06, que apresentou elevado número de partículas virais íntegras, confirmado por meio de observações ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Figura 38).

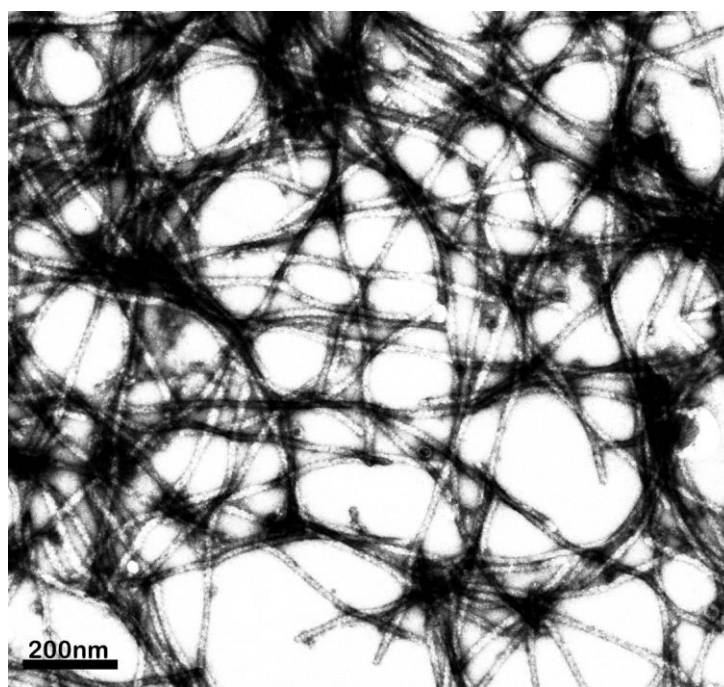


Figura 38 - Micrografia eletrônica de transmissão da preparação semipurificada do isolado T06 de turnip mosaic virus (TuMV) proveniente de raiz-forte do município de Divinolândia, SP. Observam-se partículas alongadas e flexuosas com cerca de 750 nm. Barra = 200 nm. (FONTE: Dr. Elliot W. Kitajima)

Para os outros quatro isolados virais (T22, T31, T48 e T61) não foi possível obter preparações semipurificadas com uma concentração satisfatória de partículas virais. Portanto, optou-se pela extração de RNA a partir de folhas de mostarda infectadas experimentalmente por cada isolado viral, utilizando TRIZOL[®]. Os RNAs totais extraídos foram encaminhados

para o Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ, USP) para avaliação da sua integridade. Nas análises quantitativa e qualitativa de cada amostra de RNA, avaliando-se os três parâmetros [*RNA Integrity Number* (RIN), *Ratio* [28S/18S] e concentração], verificou-se que a concentração das amostras variou entre 188 ng/μL a 2,243 ng/μL, e a *Ratio* [28S/18S] variou em torno de 1,7 a 3,0 (Figura 39). Os RNAs também se apresentaram íntegros, após análises de eletroforese, uma vez que as bandas correspondentes às unidades ribossomais 18S e 28S, respectivamente, não apresentaram rastros, indicando que não houve degradação (Figura 39). Nas análises dos eletroferogramas, foram observados picos esperados das unidades ribossomais 28S e 18S (Figura 39). Para quatro amostras (T31, T61, T48, T06) os valores de RIN variaram entre 7,9 a 8,6, considerados satisfatórios, sendo que somente para a amostra de RNA do isolado T22 o valor de RIN ficou um pouco abaixo do esperado (Figura 39 e Tabela 14). As cinco amostras de RNA foram encaminhadas para o sequenciamento.

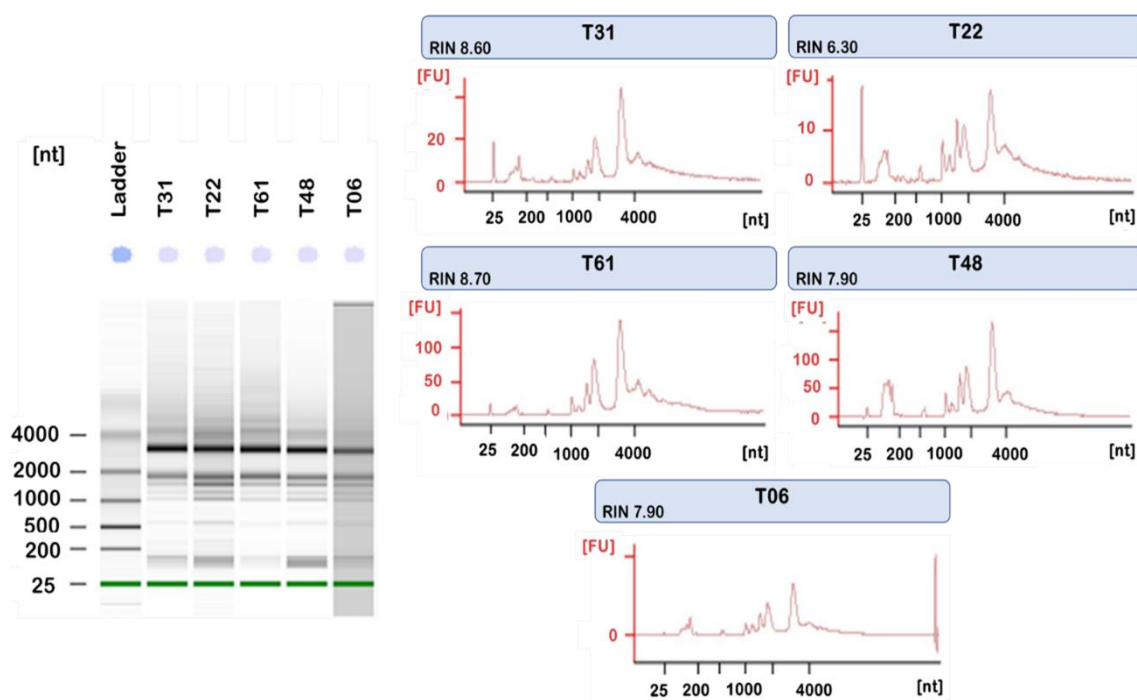


Figura 39 - Análises de integridade do RNA (RIN) total extraído diretamente de folhas de mostarda (*Brassica rapa*) das cinco amostras infectadas por isolados de turnip mosaic virus (TuMV) para realização do sequenciamento completo dos genomas virais

Tabela 14 - Parâmetros mensurados para as análises da integridade do RNA a partir dos RNA totais extraídos de folhas de mostarda (*Brassica rapa*) infectadas

Amostras	RIN	Concentração de RNA	RNA Ratio
T06	7,9	2.243	2,1
T22	6,3	188	3,0
T31	8,6	287	2,1
T48	7,9	1.173	2,2
T61	8,7	889	1,7

Legenda: RIN – *RNA integrity Number* (número relacionado à integridade do RNA)

As amostras foram submetidas a sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando o *HiSeq 2500 Illumina*. Com os dados gerados, foi possível montar 100% dos genomas dos cinco isolados de TuMV. O tamanho dos fragmentos gerados foi de 9.847 nucleotídeos para os cinco isolados, incluindo os terminais 5' e 3' não traduzidos (5'- e 3'-UTR). A composição nucleotídica não foi significativamente diferente entre os cinco isolados, apresentando a seguinte porcentagem: adenina, A (31,65 a 31,96%), uracila, U (22,20 a 22,66%), citosina, C (21,11 a 21,53%) e guanina, G (21,11 a 24,46%). Com relação à organização genômica, os cinco isolados possuem uma ORF, que codifica a poliproteína, com 9.494 nucleotídeos, flanqueada pelas regiões terminais não traduzidas 5' e 3' de 124 e 228 nucleotídeos, respectivamente. Além dessa ORF maior, uma segunda ORF, menor, com 189 nucleotídeos (PIPO), foi identificada nos cinco isolados iniciando no motivo conservado GA₆ (posição 2947 - 3136) localizado na região N-terminal da proteína P3.

Os cinco isolados possuem as sequências conservadas de nucleotídeos ACAACAT (posição 14-20) e TCAAGCA (posição 61-67) no terminal 5'-UTR. Além disso, o códon de iniciação da tradução da poliproteína, AUG, foi anotado na mesma posição, nucleotídeos 124-126. A porcentagem de identidade de nucleotídeos da ORF da poliproteína variou de 83% a 96%, enquanto a porcentagem de identidade de aminoácidos deduzidos variou entre 91% e 98% entre as sequências dos cinco isolados virais (Tabela 15)

Tabela 15 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da ORF da poliproteína dos genomas completos dos cinco isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho

Porcentagem de identidade de nucleotídeos				
Isolados	T22	T31	T48	T61
T06	83,83%	87,45%	83,96%	84,43%
T22	-	83,16%	96,53%	95,09%
T31	-	-	83,42%	83,92%
T48	-	-	-	95,58%
Porcentagem de identidade de aminoácidos				
T06	91,79%	94,66%	91,88%	92,53%
T22	-	92,25%	98,58%	97,71%
T31	-	-	92,44%	92,99%
T48	-	-	-	98,02%

Quando analisadas as porcentagens de identidade de nucleotídeos das porções genômicas correspondentes a cada proteína viral (Tabela 16), observou-se que a região genômica correspondente à CP foi a que apresentou maiores valores de porcentagem de identidade ($94\% \pm 4$) entre os isolados analisados, e menor variabilidade de nucleotídeos. Com o alinhamento de aminoácidos da CP dos cinco isolados, observou-se que todos possuíam o motivo conservado ²⁸⁸²DAG²⁸⁸⁴ (os números sobrescritos indicados antes e depois dos aminoácidos desse motivo correspondem às suas posições na poliproteína, antes do processamento pós-traducional) na região N-terminal. Além disso, observou-se também que a região N-terminal é a mais variável. No entanto, a região genômica correspondente à proteína P1 apresentou as menores porcentagens de identidade de nucleotídeos entre os isolados ($84\% \pm 7$). A região correspondente à proteína HC-Pro também apresentou os motivos ⁶⁷²PTK⁶⁷⁴, ⁴¹⁴KITC⁴¹⁷, ⁵⁴³FRNK⁵⁴⁶, ⁶⁵⁴CCCVT⁶⁵⁸, ⁶⁷⁹IGN⁶⁸¹, conservados para os cinco isolados. Na região correspondente à CI, confirmou-se a presença, nos cinco isolados, dos motivos conservados ¹³¹³GAVGSGKS¹³²⁰, ¹⁴⁸⁰LVEV¹⁴⁸⁴, ¹⁵³¹VATNIIENGVTL¹⁵⁴², ¹⁵⁷⁵GERIQLGRVGR¹⁵⁸⁶ e ¹⁹⁸⁶MYGF¹⁹⁸⁹. Com relação à proteína P3, observou-se que alguns aminoácidos se mantiveram conservados entre os isolados pertencentes ao grupo “BR”. Observou-se também que os aminoácidos localizados nas posições 1088 e 1099-1100 são suficientes para discriminar se os isolados pertencem ao grupo filogenético (B) ou ao (BR) (Tabela 17).

Tabela 16 - Comparação da porcentagem de identidade de nucleotídeos por região genômica, correspondente a cada proteína, entre os cinco isolados de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho

Região genômica (tamanho do fragmento em nucleotídeos)	Isolados	T22	T31	T48	T61
P1 (1.086)	T06	77,80%	86,92%	78,63%	82,87%
	T22	-	77,34%	96,40%	90,79%
	T31	-	-	78,45%	82,32%
	T48	-	-	-	91,25%
HC-Pro (1.374)	T06	81,65%	84,44%	81,87%	81,00%
	T22	-	81,87%	97,74%	93,88%
	T31	-	-	81,95%	82,24%
	T48	-	-	-	93,66%
P3 (1.065)	T06	79,15%	81,59%	78,87%	78,40%
	T22	-	78,87%	93,37%	95,49%
	T31	-	-	78,77%	78,68%
	T48	-	-	-	94,64%
6K1 (156)	T06	80,76%	87,82%	80,76%	80,76%
	T22	-	83,33%	92,94%	94,23%
	T31	-	-	82,69%	80,76%
	T48	-	-	-	92,30%
CI (1.932)	T06	85,41%	84,83%	85,35%	85,35%
	T22	-	83,74%	96,01%	95,96%
	T31	-	-	84,42%	84,00%
	T48	-	-	-	95,28%
6K2 (159)	T06	82,38%	81,13%	83,01%	83,64%
	T22	-	79,44%	93,08%	94,33%
	T31	-	-	79,87%	82,38%
	T48	-	-	-	96,22%
VPg (576)	T06	80,79%	86,80%	80,55%	81,59%
	T22	-	82,81%	96,18%	95,65%
	T31	-	-	81,77%	81,77%
	T48	-	-	-	96,35%
NIa (729)	T06	85,59%	88,47%	85,73%	85,32%
	T22	-	82,30%	96,29%	96,02%
	T31	-	-	82,85%	82,99%
	T48	-	-	-	98,07%
NIb (1.551)	T06	86,91%	91,48%	86,78%	87,04%
	T22	-	85,88%	96,19%	95,87%
	T31	-	-	85,88%	86,13%
	T48	-	-	-	97,80%
CP (867)	T06	90,31%	94,00%	90,19%	90,54%
	T22	-	89,73%	96,65%	97,11%
	T31	-	-	89,85%	89,73%
	T48	-	-	-	98,84%
PIPO (189)	T06	92,06%	92,06%	93,12%	91,53%
	T22	-	88,88%	98,41%	97,88%
	T31	-	-	89,41%	88,88%
	T48	-	-	-	98,41%

Tabela 17 - Diferenciação de aminoácidos relacionados na proteína P3 dos isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV)

Isolados	Grupo	Localização dos aminoácidos da proteína P3 na poliproteína				
		1051	1088	1099 - 1100	1106	1123
T06	B	Q	M	KM	N	K
T22	BR	Y	I	TI	R	R
T31	B	K	M	KM	H	Q
T48	BR	Y	I	TI	R	R
T61	BR	Y	I	TI	R	R

As análises dos sítios de clivagem da poliproteína revelaram uma substituição de aminoácido entre as proteínas P1 e HC-Pro, para os isolados T48 e T22 [fenilalanina (F) por tirosina (Y)], na região C-terminal da P1. Houve também uma substituição no sítio de clivagem entre as proteínas 6K₂ e CI [serina (S) por asparagina (N)] na região N-terminal da proteína 6K₂, para os isolados T06, T22, T48 e T61 (Figura 40).

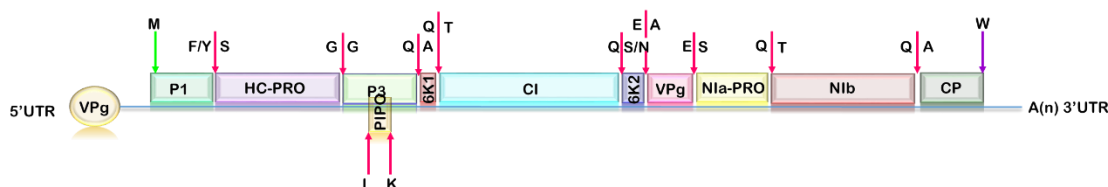


Figura 40 - Esquema do genoma do turnip mosaic virus (TuMV) com a indicação (setas) dos sítios de clivagem na poliproteína (processamento pós-traducional), para os cinco isolados sequenciados neste trabalho, que originam as proteínas virais, com os seus respectivos aminoácidos: Metionina (M); Fenilalanina (F); Tirosina (Y); Serina (S); Glicina (G); Glutamina (Q); Treonina (T); Asparagina (N); Alanina (A); Ácido glutâmico (E); Triptofano (W); Leucina (L) e Lisina (K).

Por meio das análises filogenéticas de máxima verossimilhança, que incluíram as sequências completas dos genomas dos cinco isolados de TuMV sequenciados neste trabalho (T06, T22, T31, T48, T61), observou-se que os isolados brasileiros se distribuíram em dois diferentes grupos na árvore filogenética: “Basal BR” (T22, T48, T61) e “World B” (T06 e T31) (Figura 41). O isolado T31 agrupou-se em um clado com outro isolado brasileiro (BZ1–AB093611) sustentado por um alto valor de *bootstrap* (100%). Esses dois isolados (T31 e BZ1) juntamente com o isolado T06 também formaram um grupo monofilético sustentado por um alto valor de *bootstrap* (97%). T22, T48 e T61, do grupo “BR”, também formaram um grupo

monofilético sustentado por um alto valor de *bootstrap* (100%) (Figura 41). Vale ressaltar que independente do grupo filogenético, em que os cinco isolados brasileiros se agruparam, todos foram capazes de infectar sistemicamente *R. raphanistrum* (Figura 28 e Tabela 12). Outro ponto a ser considerado é que em ambas as análises filogenéticas, CP e genoma completo, os cinco isolados de TuMV ficaram alocados nos grupos filogenéticos “BR” (T22, T48 e T61) e “World B” (T31 e T06).

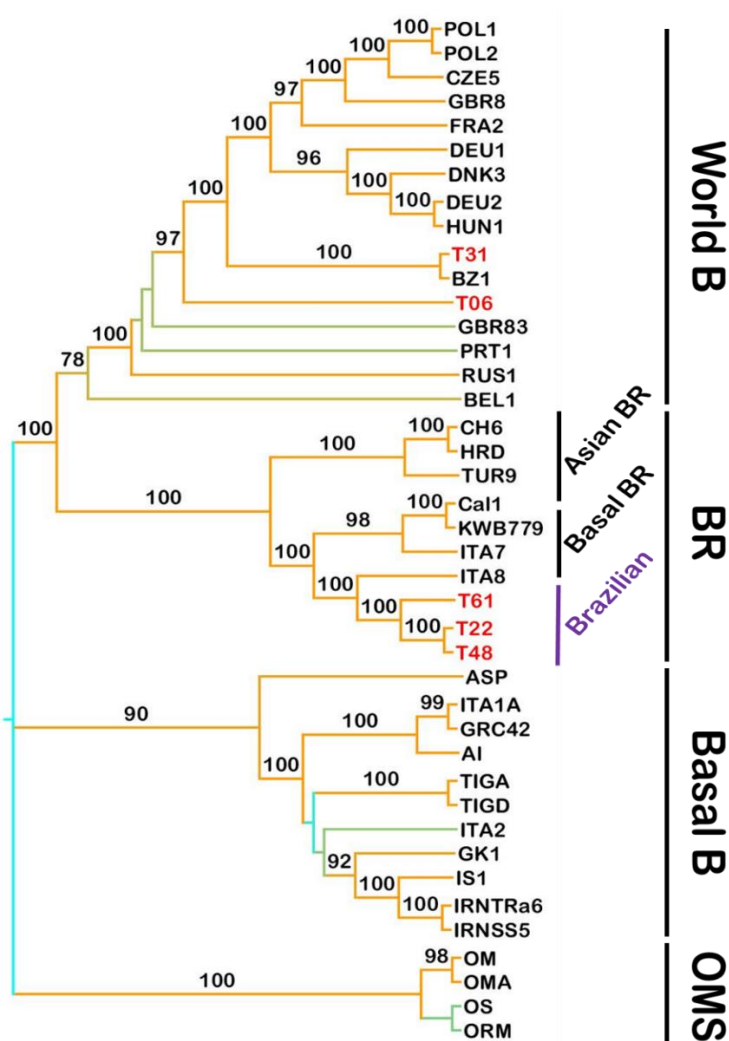


Figura 41 - Árvore filogenética obtida por meio de análise de máxima verossimilhança a partir do alinhamento múltiplo das sequências completas do genoma dos isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV): T06, T22, T31, T48 e T61. Os grupos descritos ao lado direito, assim como os isolados utilizados para filogenia com os seus respectivos códigos de acesso no *Genbank* (Tabela 9, pag 90) foram propostos por Oshima et al. (2002). Observa-se a formação de um clado (*Brazilian group*) envolvendo três isolados brasileiros no grupo filogenético “BR”. Os valores de *bootstrap* (para 1000 replicações) estão indicados acima dos ramos, sendo que os tons mais verdes indicam valores mais baixos e tons alaranjados correspondem a valores mais elevados de *bootstrap*.

Nas análises de recombinação do genoma completo dos cinco isolados brasileiros de TuMV, observou-se que para todos os isolados sequenciados ocorreu, pelo menos, um evento de recombinação. Para T06 de raiz-forte (*Azadirachta indica*) proveniente do município de Divinolândia (SP), foram observados três eventos de recombinação. O primeiro evento na porção genômica correspondente à proteína P1, sendo os parentais desse evento os isolados TIGA (*Major*) e ORM (*Minor*) de um fragmento de 563 nucleotídeos (Tabela 18). O segundo evento também ocorreu na região genômica correspondente à proteína P1 e se estendeu até a região genômica correspondente à proteína HC-Pro. Esse evento envolveu os parentais GBR83 (*Major*) e DNK3 (*Minor*), gerando um fragmento de 738 nucleotídeos (Tabela 18). O último evento de recombinação, de um fragmento de 3442 nucleotídeos, observado no genoma de T06 teve os parentais GBR83 (*Major*) e DEU1 (*Minor*) que se estendeu da porção genômica correspondente à proteína CI à CP (Tabela 18).

Tabela 18 -Eventos de recombinação que ocorreram para os cinco isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho

Isolados	Parentais		Programas									Ponto de recombinação		Região genômica
	Major	Minor	RDP	GENECONV	BootScan	MaxChi	Chimaera	SiScan	PhylPro	LARD	3 seq	Começo	Final	
T06	TIGA	ORM	2,96x10 ⁻³	-	2,65x10 ⁻¹³	4,23x10 ⁻⁶	1,49x10 ⁻⁶	3,73x10 ⁻⁷	-	-	-	17	580	P1
	GBR83	DNK3	3,71x10 ⁻¹⁵	8,23x10 ⁻¹²	-	1,94x10 ⁻⁸	1,28x10 ⁻⁵	2,37x10 ⁻¹⁴	-	-	-	608	1346	P1 a HC-Pro
	GBR83	DEU 1	8,58x10 ⁻⁸	-	-	7,99x10 ⁻¹¹	-	1,62x10 ⁻⁹	-	-	9,27x10 ⁻⁷	5552	8994	CI a CP
T22	T61	HUN1	2,90x10 ⁻²⁷	5,00x10 ⁻²¹	2,52x10 ⁻²⁶	6,62x10 ⁻¹⁰	5,73x10 ⁻¹⁰	9,00x10 ⁻¹⁰	-	-	-	118	444	P1
	ITA7	ITA8	5,34x10 ⁻¹¹	8,22x10 ⁻⁵	-	1,27x10 ⁻⁴	4,06x10 ⁻⁵	3,75x10 ⁻¹⁴	-	-	2,02x10 ⁻¹³	2013	9374	HC-Pro a CP
	ITA8	ITA7	5,61x10 ⁻⁶	-	-	1,96x10 ⁻⁶	7,23x10 ⁻⁵	-	-	-	-	6929	7871	NIa a NIB
T31	TIGA	ORM	2,96x10 ⁻¹³	-	2,64x10 ⁻¹³	4,23x10 ⁻⁶	1,49x10 ⁻⁶	3,73x10 ⁻⁷	-	-	-	15	585	P1
T48	T61	HUN1	2,90x10 ⁻²⁷	5,00x10 ⁻²¹	2,52x10 ⁻²⁶	6,62x10 ⁻¹⁰	5,73x10 ⁻¹⁰	9,00x10 ⁻¹⁰	-	-	-	120	453	P1
	T61	T22	9,87x10 ⁻⁴	-	-	2,89x10 ⁻⁴	-	-	-	-	8,41x10 ⁻⁴	2013	6226	HC-Pro a NIa
	ITA7	ITA8	5,34x10 ⁻¹¹	8,22x10 ⁻⁵	-	1,27x10 ⁻⁴	4,06x10 ⁻⁵	3,75x10 ⁻¹⁴	-	-	2,02x10 ⁻¹³	1844	-	-
	ITA8	ITA7	5,61x10 ⁻⁶	-	-	1,96x10 ⁻⁶	7,23x10 ⁻⁵	-	-	-	-	6929	7871	NIa a NIB
T61	TIGA	ORM	2,96x10 ⁻¹³	-	2,64x10 ⁻¹³	4,23x10 ⁻⁶	1,49x10 ⁻⁶	3,73x10 ⁻⁷	-	-	-	17	549	P1
	ITA8	ITA7	5,61x10 ⁻⁶	-	-	1,96x10 ⁻⁶	7,23x10 ⁻⁵	-	-	-	-	6854	7998	NIa a NIB
	ITA7	ITA8	5,34x10 ⁻¹¹	8,22x10 ⁻⁵	-	1,27x10 ⁻⁴	4,06x10 ⁻⁵	3,75x10 ⁻¹⁴	-	-	2,02x10 ⁻¹³	1844	-	-

Para o isolado T22, ocorreram três eventos de recombinação. O primeiro evento originou-se dos parentais T61 (*Major* - isolado brasileiro de TuMV sequenciado neste trabalho) e HUN1 (*Minor*) de um fragmento de 362 nucleotídeos. Já os outros dois eventos foram derivados dos parentais ITA7 e IT8, sendo que um dos eventos ocorreu no intervalo do genoma correspondente às proteínas HC-Pro e CP (fragmento recombinante de 7361 nucleotídeos). O outro evento foi uma sobreposição do primeiro, ocorrendo no intervalo entre as proteínas NIa e NIb gerando um fragmento recombinante de 942 nucleotídeos (Tabela 18).

No caso de T31, ocorreu apenas um evento de recombinação entre TIGA (*Major*) e ORM (*Minor*) na região genômica da proteína P1, gerando um fragmento recombinante de 570 nucleotídeos (Tabela 18). Para o isolado T48 ocorreram quatro eventos de recombinação, com T61 (*Major*) e T22 (*Minor*) como os parentais, que engloba uma região genômica correspondente à proteína HC-Pro e se estendeu até a porção genômica correspondente a NIa (fragmento de 1391 nucleotídeos) (Tabela 18). O isolado T61 (*Major*) juntamente com HUN1 (*Minor*) foram os parentais do segundo evento que ocorreu na porção genômica correspondente à P1 (fragmento de 333 nucleotídeos). Os outros dois eventos foram gerados pelos parentais ITA8 e ITA7 (fragmento recombinado de 942 nucleotídeos) entre as porções genômicas que codificam as proteínas NIa e NIb (Tabela 18).

Por fim, para T61, identificaram-se três eventos de recombinação. TIGA e ORM foram os parentais de um desses eventos (fragmento de 532 nucleotídeos) na porção genômica correspondente à proteína P1 (Tabela 18). ITA7 e ITA8 participaram de dois eventos de recombinação, sendo o primeiro correspondente ao às porções genômicas que codificam as proteínas NIa e NIb (fragmento recombinante de 1144 nucleotídeos). O outro evento envolvendo esses dois parentais ocorreu na porção genômica corresponde à proteína HC-Pro (Tabela 18).

As sequências parciais e completas dos isolados brasileiros de TuMV obtidas neste trabalho foram depositadas no *Genbank* gerando os códigos de acesso disponíveis na Tabela 19.

Tabela 19 - Códigos de acesso no *Genbank* das sequências dos isolados brasileiros de turnip mosaic virus (TuMV) sequenciados neste trabalho correspondentes à capa proteica, CP, completa, inclusão citoplásmica cilíndrica, CI, parcial e do genoma completo de cinco isolados de TuMV

Número dos isolados	Código no <i>Genbank</i> CP (866 nucleotídeos)	Código no <i>Genbank</i> CI (605 nucleotídeos)	Código no <i>Genbank</i> Sequência completa (9.847 nucleotídeos)
T03	MK357826	MK249371	-
T04	MK357827	MK249372	-
T05	MK357828	MK307956	-
T06	-	-	MK241971
T07	MK357829	MK307957	-
T10	MK357830	MK307958	-
T18	MK357831	MK307959	-
T20	-	MK307960	-
T21	MK357832	MK307961	-
T22	-	-	MK241972
T23	MK357833	MK307963	-
T24	MK357834	MK307964	-
T26	MK357835	MK307965	-
T27	MK357836	MK307966	-
T31	-	-	MK241973
T33	MK357837	MK307968	-
T34	MK357838	MK307969	-
T45	-	MK307970	-
T46	MK357839	MK307971	-
T47	MK357840	MK307972	-
T48	-	-	MK241974
T51	MK357841	MK307974	-
T53	MK370467	MK307975	-
T54	MK370468	MK307976	-
T56	MK370469	MK307977	-
T57	MK370470	MK307978	-
T60	MK370471	MK307979	-
T61	-	-	MK241975
T65	MK370472	MK307980	-
T70	-	MK307982	-
T78	MK370473	MK307983	-
T81	MK370474	MK307981	-
T82	MK370475	MK307984	-
T84	MK370476	MK307985	-
T87	MK370477	MK307986	-
T91	MK370478	MK30787	-
T92	MK370479	MK307988	-
T93	MK370480	MK307989	-
T96	-	MK307990	-
T101	MK370481	MK307991	-
T103	MK370482	MK307992	-
T104	MK370483	MK307993	-
T106	MK370484	MK307994	-
T110	MK370485	MK307995	-

6 DISCUSSÃO

6.1 LEVANTAMENTO, TESTES BIOLÓGICOS E PATOTIPAGEM

O turnip mosaic virus (TuMV) é considerado o vírus mais importante que infecta brássicas e, atualmente, há registros de sua ocorrência em regiões de clima temperado, subtropical e tropical em países da África, Ásia, Europa, Oceania e nas Américas (WALSH et al., 2002). Entretanto, até então, pouco se conhecia sobre a ocorrência e diversidade genética desse vírus na América do Sul, principalmente no Brasil, onde havia alguns relatos da sua ocorrência em diferentes hospedeiras nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná e Distrito Federal (Tabela 1).

No levantamento realizado no presente trabalho, por meio de coletas de plantas com suspeita de infecção viral em campos de produção de brássicas, em diferentes regiões do Brasil, identificou-se a presença do TuMV em 37,61% do total das amostras coletadas. O TuMV foi detectado também em co-infecções duplas ou triplas com o cole latent virus (CoLV) e/ou com o cauliflower mosaic virus (CaMV). Porém, essas coinfeções corresponderam a somente 4,57% do total de amostras analisadas. O CoLV e o CaMV também foram identificados em algumas amostras em infecções simples e em coinfeções, representando somente 13,74% do total das amostras. Portanto, com esses resultados, confirmou-se que o TuMV é o vírus prevalente nos campos de brássicas no Brasil. Embora a incidência do TuMV tenha sido baixa na maioria das áreas visitadas, constataram-se epidemias em cultivos de couve-chinesa, no Estado de São Paulo, com incidências superiores a 60%, com sintomas generalizados de mosaico, amarelecimento e necrose, impossibilitando a comercialização das plantas, com consequentes perdas para os produtores (RODRIGUES et al., 2015). Do total de amostras coletadas, 48 (44,00 %) apresentavam algum tipo de sintoma similar aos induzidos por vírus. Porém, não foi possível identificar a presença de nenhum dos três vírus avaliados no presente trabalho (TuMV, CoLV e CaMV). Este fato pode estar associado à presença de outros vírus ou outros fatores bióticos e/ou abióticos, que podem gerar dúvida na avaliação e identificação da presença ou não de vírus no campo.

Em levantamentos realizados em Dorset, Reino Unido, por meio de coletas de brássicas silvestres, observou-se que 43% das amostras estavam infectadas pelo TuMV (RAYBOULD et al., 1999). Em um levantamento realizado em 28 países, em regiões de clima temperado, subtropical e mediterrânico (não especificadas pelo autor), o TuMV ficou atrás somente do cucumber mosaic virus (CMV), sendo considerado o segundo vírus que causa os

maiores prejuízos em culturas de interesse econômico (TOMLINSON, 1987). Devido à importância econômica dos cultivos de canola (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) no Iran, e às recorrentes epidemias de viroses, causando perdas consideráveis na produção de grãos, foi realizado um levantamento, com coletas de 580 amostras. Dos cinco vírus identificados nessas amostras, o TuMV estava presente em somente 9,3%. No entanto, o TuMV juntamente com o CaMV e o beet western yellows virus (BWYV, *Polerovirus*) foram considerados os principais vírus com potencial de causar danos na produção de canola naquele país (SHAHRAEEN, FARZADF & LESEMAN, 2003).

O TuMV pode infectar mais de 318 espécies de plantas pertencentes a 156 gêneros distribuídos em 43 famílias botânicas. Devido à elevada variabilidade genética de seus isolados, que reflete diretamente no seu comportamento biológico, diversos autores, ao longo das últimas cinco décadas, propuseram formas de classifica-los e agrupa-los (YOSHII, 1963; MCDONALD & HIEBERT, 1975; PROVVIDENTI, 1980; WALSH, 1989; FUJISAWA, 1990; SHATTUCK, 1992). Atualmente, é adotada a classificação proposta por Jenner e Walsh (1996), que agrupa os isolados de TuMV em doze patotipos, de acordo com os sintomas induzidos em linhagens diferenciadoras de *Brassica napus* (R4, S1, S6 e 165). Essas linhagens possuem (ou não) genes de resistência, que permitem diferenciar os isolados de acordo com a reação à inoculação. Com a descoberta de novos genes de resistência e com o intuito de refinar os testes de patotipagem, foram sendo agregadas novas linhagens de *B. napus*, como a 22S que possui o gene *TURB03*, que permite diferenciar os patotipos 1, 3 e 4 (HUGHES et al., 2003).

Para os isolados brasileiros de TuMV patotipados neste trabalho, independente da hospedeira da qual foi isolado, região geográfica ou dos sintomas induzidos na hospedeira original, constatou-se a predominância do patotipo 1. Esses resultados corroboram os descritos por Jenner e Walsh (1996), que concluíram que 78% dos isolados de TuMV (provenientes de diferentes regiões do mundo) pertencem aos patotipos 1, 3 ou 4. Alguns isolados brasileiros analisados neste trabalho (T03, T06, T21, T22, T26, T34, T48, T57 e T61), entretanto, induziram reações diferentes nas linhagens diferenciadoras de *B. napus*. Há duas hipóteses para explicar esses resultados: (i) esses isolados podem ser variantes dos patotipos já conhecidos; ou (ii) podem ser novos patotipos do TuMV, que não se encaixam na classificação proposta por Jenner & Walsh (1996). Assim, a classificação adotada, atualmente, poderia ser revista para acomodar novos patotipos, principalmente aqueles provenientes de regiões de clima tropical, uma vez que a maioria dos isolados de TuMV utilizados para a adoção dessa classificação é proveniente de regiões de clima temperado (JENNER & WALSH, 1996).

No Brasil, os primeiros relatos do TuMV, em cultivos comerciais de brássicas, foram feitos nas décadas de 1970 e 1980, em áreas de plantios de couve e couve-flor nos Estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Distrito Federal (COSTA et al., 1972; DE ÁVILA et al., 1980; LIMA et al., 1984). Dos cinco isolados de TuMV caracterizados no presente trabalho (T06, T22, T31, T48 e T61), somente T31 e T48 foram capazes de infectar brócolis, enquanto os isolados T31 e T06 infectaram couve-flor. Em estudos realizados por Green e Deng (1985), em Taiwan, ao caracterizarem isolados de TuMV de mostarda, couve-chinesa e rabanete, os autores obtiveram resultados semelhantes ao desafiarem variedades de couve-flor. Alguns isolados foram capazes de infectar as variedades de couve-flor, induzindo sintomas de mosaico ou mesmo em infecções sem a indução de sintomas (latência). Porém, a maioria não foi capaz de infectar couve-flor (GREEN & DENG, 1985). Resultados similares foram obtidos com T22, T48 e T61, que não foram capazes de infectar variedades de *B. oleracea*, corroborando os resultados de Ribeiro-Junior et al. (2017), em que isolados brasileiros de TuMV de rúcula e nabiça também não foram capazes de infectar brócolis e couve-flor. Em um trabalho de caracterização biológica, isolados australianos de TuMV também não foram capazes de infectar variedades de *B. oleracea* (NYALUGWE et al., 2015). Em outro trabalho envolvendo isolados provenientes da Austrália oriental, observou-se que também não foram capazes de infectar couve-flor, porém três deles foram capazes de infectar brócolis (GUERRET et al., 2017).

O TuMV já foi descrito infectando repolho em diversos países (BRUNT et al., 1997; TOMLINSON, 1970; SEVIK & DELIGOZ, 2016). Sevik e Deligoz (2016) relataram a presença desse vírus em cultivos comerciais de repolho na Turquia. No entanto, os cinco isolados desafiados neste trabalho não foram capazes de infectar variedades de repolho. Esses resultados corroboram parcialmente os obtidos por Guerret et al. (2017), em que os autores, a partir de inoculações mecânicas em plântulas de repolho, constataram que dois dos cinco isolados avaliados não foram capazes de infectar essa variedade. Os três isolados capazes de infectar repolho induziram mosaico e/ou anéis cloróticos sistêmicos e, em alguns casos, as infecções transcorreram sem a indução de sintomas, mas o vírus foi capaz de infectar as plantas sistemicamente. Em outro levantamento realizado na Turquia, observou-se que de dois isolados de TuMV avaliados, somente um foi capaz de induzir sintomas de mosaico sistêmico em três diferentes variedades de repolho (KORKMAZ et al., 2008). Em teoria, esses resultados são intrigantes, uma vez que, nas variedades de *B. oleracea* ainda não foi relatado nenhum gene de resistência a vírus, e assim deveriam ser suscetíveis aos isolados de TuMV.

Os cinco isolados de TuMV caracterizados neste trabalho também foram capazes de infectar três variedades (lisa, crespada e japonesa) de mostarda (*B. rapa*). Esses resultados

corroboram com os obtidos por Guerret et al. (2017), que inocularam mecanicamente cinco isolados australianos de TuMV, os quais foram capazes de infectar mostarda, induzindo pontos cloróticos locais ou mosaico sistêmico ou, em alguns casos, as infecções transcorreram sem a indução de sintomas. Korkmaz et al. (2008) também relataram a indução de sintomas severos de mosaico em mostarda, induzidos por dois isolados turcos de TuMV. Na literatura, a mostarda crespa tem sido descrita como hospedeira do TuMV e recomendada para a propagação do vírus *in planta* (BRUNT et al., 1997; TOMLINSON, 1970).

A couve-chinesa é considerada hospedeira do TuMV (BRUNT et al., 1997; TOMLINSON, 1970). Porém, dos cinco isolados avaliados neste trabalho, somente T31 e T48 foram capazes de infectar essa espécie. Vale ressaltar que, durante levantamentos realizados em 2015, o isolado T48 foi coletado em um cultivo de couve-chinesa no Estado de São Paulo. Naquela ocasião, constataram-se perdas superiores a 60% da produção de couve-chinesa devido às infecções pelo TuMV (RODRIGUES et al., 2015). Ribeiro-Junior et al. (2017) mostraram que um isolado de TuMV de rúcula também foi capaz de infectar sistemicamente plantas de couve-chinesa, induzindo sintoma de mosaico.

Os isolados também foram capazes de infectar sistemicamente rúcula. Recentemente, em cultivos comerciais de rúcula no município de Botucatu, SP, foi constatada a presença do TuMV (RIBEIRO-JUNIOR et al., 2017). Lima et al. (1984) já haviam relatado a ocorrência do TuMV em cultivos comerciais de rúcula no Estado de São Paulo. Isolados de TuMV de outros países também foram capazes de infectar esta hortaliça, causando desde pontos necróticos locais a mosaico sistêmico, sintomas que variaram de acordo com o isolado viral (NYALUGWE et al., 2015; GUERRET et al., 2017; KORKMAZ et al., 2008).

Os isolados brasileiros também foram capazes de infectar plantas de alface lisa, que expressaram sintomas de clareamento de nervuras 30 dias após as inoculações. No hemisfério Norte o TuMV é um vírus considerado importante em alface crespa, principalmente nas variedades derivadas da linhagem P.I. 91532, que são resistentes a míldio (ZINK & DUFFUS, 1970). Porém, no Brasil, ainda não havia relatos desse vírus infectando naturalmente essa hospedeira. Recentemente, porém, um isolado de TuMV foi identificado causando sintomas de mosaico em alface em campos de produção dessa hortaliça no Estado de São Paulo (RIBEIRO-JUNIOR et al., 2018). Os autores, entretanto, não especificaram a variedade da alface afetada, tampouco o local em que o isolado viral foi identificado. De qualquer forma, esses resultados indicam que uma atenção especial deve ser dada ao TuMV, vírus até então negligenciado nos cultivos de alface e, também, em outras hortaliças, incluindo as brássicas, no Brasil.

Os isolados T48 e T61 infectaram sistemicamente rabanete, corroborando com os resultados obtidos por Colariccio et al. (2000), quando avaliaram por testes biológicos nove isolados brasileiros de TuMV, sendo todos capazes de induzir mosaico sistêmico em rabanete. Em Taiwan, o TuMV foi relatado causando perdas consideráveis em campos de produção de rabanete, couve-chinesa e mostarda (GREEN & DENG, 1985). Porém, isolados australianos não foram capazes de infectar essa espécie (NYALUGWE et al., 2015; GUERRET et al., 2017). Na Turquia, somente um isolado infectou sistemicamente rabanete, causando mosaico (KORKMAZ et al., 2008). Suehiro et al. (2004) observaram que a capacidade de um isolado de TuMV infectar ou não rabanete está relacionada com a presença de aminoácidos situados na porção genômica correspondente à proteína P3. Os isolados que infectaram rabanete apresentaram os aminoácidos conservados ¹¹²³R, ¹⁰⁵¹Y ¹¹⁸⁸I, ¹⁰⁹⁹TI¹¹⁰⁰ e ¹¹⁰⁶R, enquanto que aqueles que não foram capazes de infectar apresentaram uma variabilidade maior de aminoácidos nessas regiões: ^{1023/1051}Q/K, ¹⁰⁸⁸M, ¹⁰⁹⁹KM¹¹⁰⁰, ¹¹⁰⁶H/Q/N. Assim, os resultados obtidos neste trabalho corroboram os descritos por Suehiro et al. (2004), uma vez que os isolados T48 e T61, que infectaram rabanete e os isolados T06 e T31, que não foram capazes de infectar essa hospedeira, apresentaram os mesmos resíduos de aminoácidos descritos acima.

A presença constante de plantas de nabiça (uma espécie da vegetação espontânea, muitas vezes considerada planta daninha), com sintomas de mosaico, nos campos de produção de hortaliças, principalmente de brássicas, no Brasil (LORENZI, 2008), sugere que essa espécie pode ter um papel importante na epidemiologia do TuMV. No levantamento realizado neste trabalho, observou-se que essa espécie apresentou uma taxa de infecção por TuMV de 17,42% (Tabela 10). Em levantamentos realizados em Dorset (Reino Unido), em espécies de brássicas silvestres, os autores observaram a presença de quatro vírus infectando naturalmente essas plantas, sendo que a presença do TuMV foi confirmada em 43% das amostras (RAYBOULD et al., 1999). A proporção de plantas de nabiça infectadas com o TuMV se assemelha a outras infecções virais descritas em plantas da vegetação espontânea. No norte do Japão, 93% das plantas de *Eupatorium chinensis* (Asteraceae) estavam infectadas com o tobacco leaf curl virus (vírus pertencente ao gênero *Begomovirus*) (YAHARA & OYAMA, 1993). Já na Austrália, constatou-se a presença do tobacco mosaic virus em 93% das plantas de *Nicotiana glauca* (RANDLES, PALUKAITIS & DAVIES, 1981). As infecções virais são comumente observadas em plantas da vegetação espontânea, no entanto, em sua maioria, transcorrem sem a expressão de sintomas perceptíveis, o que faz com que as taxas de infecção e incidência do vírus sejam muitas vezes subestimadas (RAYBOULD et al., 1999). De fato, infecções assintomáticas têm sido frequentemente observadas em comunidades vegetais

naturais (PRENDEVILLE et al., 2012), sendo que nas interações vírus-planta, as infecções que levam à ocorrência de sintomas severos são observadas, mais comumente, nas variedades/espécies cultivadas (MAY & ANDERSON, 1983). Infecções assintomáticas são frequentemente observadas em comunidades de plantas da vegetação espontânea, sendo que a maioria se caracteriza por apresentar baixos títulos virais, além desses vírus serem raramente transmitidos horizontalmente por insetos vetores (LI et al., 2016).

No presente trabalho, espécies de plantas indicadoras e espécies da vegetação espontânea foram desafiadas com cada um dos cinco isolados de TuMV (T06, T22, T31, T48 e T61). *Nicotiana tabacum* “Samsun NN”, “White Burley”, “Xanthi” e *N. sylvestris* reagiram com sintomas locais nas folhas inoculadas, o que está de acordo com o descrito para isolados de TuMV na literatura internacional (TOMLINSON, 1970; PROCHÁZKOVÁ, 1980; COLARICCIO et al., 2000). *Nicotiana benthamiana* comportou-se como altamente susceptível aos cinco isolado virais, o que também está de acordo com os resultados da literatura (RIBEIRO-JUNIOR et al., 2017; NYALUGWE et al., 2015; GUERRET et al., 2017). T22 e T61 não foram capazes de infectar *N. glutinosa*, enquanto T06 e T48 induziram lesões locais necróticas e cloróticas, respectivamente. Os sintomas induzidos por T31 divergiram daqueles descritos até o presente momento em *N. glutinosa*, uma vez que induz necrose sistêmica, indicando ser este um isolado mais severo nessa hospedeira, em comparação com os demais isolados analisados. Anéis necróticos e manchas cloróticas locais, além de mosaico sistêmico já foram relatados como sintomas induzidos por outros isolados brasileiros de TuMV em *N. glutinosa* (COLARICCIO et al., 2000; RIBEIRO-JUNIOR et al., 2017). Na Austrália, muitos isolados de TuMV não foram capazes de infectar *N. glutinosa*. No entanto, aqueles que foram capazes de infectar essa espécie induziram sintomas de manchas cloróticas e/ou mosaico sistêmico (NYALUGWE et al., 2015; GUERRET et al., 2017). Isolados de TuMV provenientes da antiga Checoslováquia (atual República Checa), induziram diferentes tipos de sintomas (nanismo, mosaico e clorose) em *N. glutinosa* (PROCHÁZKOVÁ, 1980). Esses isolados da República Checa também foram capazes de induzir sintomas locais em *N. megalosiphom* (PROCHÁZKOVÁ, 1980), divergindo dos resultados obtidos neste trabalho, em que os isolados brasileiros de TuMV não infectaram essa hospedeira. Os isolados brasileiros, porém, foram capazes de induzir lesões necróticas locais em *Chenopodium amaranticolor* e *Gomphrena globosa*, o que está de acordo com os dados de literatura para esse vírus (NYALUGWE et al., 2015; GUERRET et al., 2017, RIBEIRO-JUNIOR, 2017; TOMLINSON, 1970; PROCHÁZKOVÁ, 1980; COLARICCIO et al., 2000).

6.2 TRANSMISSÃO POR AFÍDEOS

O TuMV pode ser transmitido por mais de 80 espécies de afídeos de maneira não persistente, não havendo a necessidade de colonização da planta para a sua aquisição e transmissão (WALSH et al., 2002). Assim, várias espécies de afídeos especialistas e/ou generalistas são capazes de introduzir o TuMV em novas áreas cultivadas (transmissão primária) bem como disseminá-lo entre as plantas no interior dessas áreas (transmissão secundária) (SHATTUCK, 1992). Por outro lado, o sistema vetor/patógeno/hospedeiro é caracterizado por complexas interações diretas e indiretas, sendo que plantas infectadas por vírus podem causar efeitos deletérios, neutros, ou até mesmo benéficos para os vetores (ANDRET-LINK & FUCHS, 2005). Estudos recentes revelaram que algumas relações entre patógenos e seus vetores diferem dependendo da espécie, linhagem ou da planta hospedeira associada (KERSH-BECKER & THALER, 2014). Entretanto, apesar da maioria dos vírus de importância econômica ser transmitida por afídeos de maneira não persistente, as inter-relações raramente são investigadas devido ao tempo de contato extremamente curto entre o vírus e seu vetor (HULL, 2014; MAUCK, CONSUELO & MARK, 2010).

No presente trabalho, observou-se, nos experimentos de eficiência de transmissão, que *Brevicoryne brassicae* (espécie de afídeo monófaga/especialista) foi menos eficiente na transmissão do TuMV, quando foram simuladas as possíveis interações para a transmissão primária (nabiça/nabiça, nabiça/mostarda, mostarda/nabiça). Spak (1992), ao avaliar a eficiência de aquisição do TuMV por *B. brassicae*, em duas diferentes espécies de mostarda (*Sinapis alba* – mostarda-branca, e *Brassica nigra* – mostarda-negra), constatou que a interação afídeo-hospedeiro interferiu na aquisição do vírus. O autor demonstrou que *B. brassicae* foi mais eficiente na transmissão do TuMV quando se alimentou de plantas de *B. nigra* infectadas (16,7%) em comparação a plantas de *S. alba* (4,8%). Independentemente das taxas de transmissão obtidas, Everstsen (1974) concluiu que, uma vez estabelecida a infecção, o TuMV pode ser disseminado de forma relativamente rápida em campos de produção (transmissão secundária).

Nos testes de transmissão com *B. brassicae*, observou-se que a coexistência de plantas da vegetação espontânea (nabiça – *R. raphanistrum*) com plantas de brássicas cultivadas tem influência na manutenção do potencial de inóculo e disseminação primária do TuMV. Fato também constatado por Kamitani et al. (2018), que observaram que todos os isolados de TuMV obtidos de *Arabidopsis halleri*, em comunidades de plantas da vegetação espontânea, estavam intimamente relacionados com isolados identificados em espécies de brássicas cultivadas,

comprovando que houve transmissão do vírus entre essas espécies. Esses estudos auxiliam na compreensão da emergência e consequentes epidemias em culturas de importância econômica, fato observado para o CMV e o alfalfa mosaic virus (AMV) em cultivos de feijão, em Wisconsin, EUA, e suas inter-relações com plantas da vegetação espontânea adjacentes aos campos de produção (MUELLER, CECCON & ROSOLEN, 2011).

Nas avaliações da eficiência de transmissão de brássica para outras hospedeiras (simulação de uma possível transmissão secundária) utilizando um único espécime de *B. brassicae*, observou-se que essa espécie de afídeo não foi capaz de transmitir o TuMV entre plantas cultivadas da mesma espécie (de mostarda para mostarda). Inferiu-se, com este resultado, que *B. brassicae* pode não ser eficiente na transmissão secundária do TuMV, em áreas de cultivo, quando em baixas taxas populacionais. No Brasil, *B. brassicae* foi relatada constituindo colônias em brássicas cultivadas (repolho, couve-flor, brócolis, mostarda, couve-chinesa) (SOUZA-SILVA & ILHARCO 1995), fato que pode ter uma interferência negativa no papel desses afídeos na transmissão secundária do TuMV.

Em estudos de interação vírus-vetor realizados no Japão, observou-se a ocorrência de mutualismo positivo com aumento da taxa populacional de colônias de *Lipaphis erysimi* (espécie de afídeo monófaga/especialista) em plantas de nabo infectadas com o TuMV (ADACHI et al., 2018). A espécie *B. brassicae*, por apresentar um comportamento biológico semelhante ao de *L. erysimi*, provavelmente também possa estabelecer uma relação mutualística positiva com outras espécies de *Brassica* e *Raphanus* infectadas com o TuMV. Portanto, apesar da relação mutualística positiva entre espécies de afídeos monófagas com plantas infectadas pelo TuMV, aliada ao fato de que quando se empregou um único espécime de *B. brassicae* houve baixas taxas de transmissão do TuMV na simulação de transmissão secundária, sugere-se que esta espécie de afídeo não deve ter um papel importante na epidemiologia do TuMV nas áreas de cultivo de brássicas, principalmente quando mantidas em baixas taxas populacionais.

Por outro lado, *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*, ambas polífagas/generalistas, são consideradas as principais espécies vetoras do TuMV no mundo (WALSH et al., 2002). Além disso, *M. persicae*, no Brasil, também foi relatada colonizando brássicas cultivadas (SOUZA-SILVA & ILHARCO, 1995). Nos testes de transmissão realizados com essa espécie de afídeo e um isolado brasileiro de TuMV, observou-se que independentemente de sua interação com as plantas da vegetação espontânea e/ou cultivadas, as taxas de transmissão não diferiram estatisticamente entre si. Porém, considerando a porcentagem de transmissão, *M. persicae* foi mais eficiente na combinação nabiça/mostarda, fato que sugere que essa espécie de afídeo pode ser eficiente na transmissão primária.

Como observado para *B. brassicae*, as taxas de aquisição do TuMV por *M. persicae* também variaram de acordo com a espécie de planta hospedeira. Spak (1992), utilizando duas espécies de mostarda e dois diferentes tempos de aquisição (5 e 45 minutos), observou que independentemente do tempo de aquisição, as maiores taxas de aquisição por *M. persicae* ocorreram em mostarda-branca (*S. alba*) (13,6% para 5 minutos e 10,7% para 45 minutos) quando comparadas com mostarda-negra (*B. nigra*) (3,1% para cinco minutos, e 3,3% para 45 minutos). Independentemente das taxas de aquisição, Fujisawa (1985), utilizando apenas um afídeo (*Myzus persicae*) por planta, constatou uma taxa de transmissão de 37,5% do TuMV para plantas de nabo. Esses resultados divergem dos obtidos para essa espécie nos experimentos realizados neste trabalho, cujas taxas de transmissão variaram de 4,76% (nabiça/nabiça) a 19,4% (nabiça/mostarda).

Mesmo diante de uma baixa taxa de transmissão por *M. persicae*, Nishi (1963) demonstrou que essa espécie foi capaz de reter partículas do TuMV por um período de 3 a 5 horas, quando o afídeo não se alimentou imediatamente de plantas saudas. Além disso, em trabalhos envolvendo interações hospedeiro/TuMV/afídeo vetor, observou-se que plantas infectadas com o TuMV não influenciaram no crescimento populacional de *M. persicae* (ADACHI et al., 2018). No presente trabalho, a combinação da baixa eficiência de transmissão aliada à sua capacidade de colonizar brássicas (baixa mobilidade), sugere que quando em baixas taxas populacionais, essa espécie de afídeo não deve ser a principal responsável pela disseminação (transmissão secundária) do vírus no campo.

Em contrapartida, para *Aphis fabae* (polífago/generalista), relatada no Brasil como uma espécie que não coloniza brássicas (SOUZA-SILVA & ILHARCO, 1995), nos testes de eficiência de transmissão, observou-se pouca relação na transmissão do TuMV, principalmente quando a aquisição foi realizada em nabiça (planta da vegetação espontânea). Entretanto, quando se avaliou a transmissão de mostarda para mostarda (experimento que simula a transmissão secundária no campo), *A. fabae* comportou-se como a mais eficiente entre as três espécies avaliadas, o que sugere que *A. fabae* pode estar diretamente associada com a dispersão do TuMV dentro das áreas cultivadas. Essa hipótese pode ser sustentada pelo fato de *A. fabae* ser uma espécie polífaga, que interage com mais de 100 espécies de plantas, e por se caracterizar como uma espécie de afídeo adaptada às condições tropicais e subtropicais (BLACKMAN & EASTOP, 2011). Resultados similares foram observados em estudos epidemiológicos em outros patossistemas, evidenciando a relação direta de *A. fabae* com a dispersão de outros potyvírus como o cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) em

maracujazeiro (GRACÊZ et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016), e o lettuce mosaic virus (LMV) em alface (CHAVES et al., 2006).

Nos testes de transmissão massal (cinco afídeos por planta), realizados neste trabalho, as espécies de afídeos mais eficientes na transmissão do TuMV foram, respectivamente, *A. fabae*, *M. persicae* e *B. brassicae*. Esses ensaios sugerem que o hábito alimentar desses afídeos pode influenciar na dispersão do TuMV. Esse fato pode ser explicado, uma vez que espécies polífagas tendem a realizar uma maior quantidade de voos de reconhecimento do hospedeiro e, conseqüentemente, um maior número de picadas de prova (ATIRI et al., 1986). Esses mesmos autores, em avaliações do patossistema CABMV-Caupi (*Vigna unguiculata* - Fabaceae), observaram que espécies de afídeos que não colonizam Fabaceae são menos eficientes na transmissão secundária do vírus no campo. Porém, no patossistema TuMV-*Brassica*, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que justamente a espécie de afídeo que não coloniza Brassicaceae (*A. fabae*) deve ter um papel mais relevante na capacidade de disseminação do vírus no campo.

6.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISSOLADOS BRASILEIROS DE TuMV

De acordo com estudos filogenéticos e de patogenicidade, os isolados de TuMV podem ser classificados em dois patotipos: (B) – são capazes de infectar espécies do gênero *Brassica*, mas não infectam espécies do gênero *Raphanus*; e (BR) – são capazes de infectar tanto *Brassica* spp. como *Raphanus* spp. (OSHIMA et al., 2002). Dessa forma, em estudos filogenéticos realizados a partir de genomas completos, capa proteica (CP) e proteína P1, os isolados de TuMV foram subdivididos em quatro grandes grupos: “**Basal B**”, que engloba isolados pertencentes ao patotipo (B) provenientes de brássicas e de não brássicas do Sudoeste e do Centro da Eurásia; “**World B**”, constituído por isolados de todos os continentes, sendo a maioria pertencentes ao patotipo (B); e “**BR**”, que foi subdividido em dois subgrupos: “**Asian BR**”, composto por isolados do patotipo (BR) provenientes de brássicas e *Raphanus* do Leste da Ásia, principalmente do Japão, e “**Basal BR**” composto por isolados do patotipo (BR) provenientes da Eurásia (OSHIMA et al., 2002). O quarto e último grupo, “**OMs**”, abriga isolados de TuMV que infectam orquídeas (GIBBS et al., 2015).

Com relação à associação do grupo filogenético de TuMV e dois afídeos vetores, Adachi et al. (2018) constataram que o crescimento populacional do afídeo generalista *M. persicae* não diferiu significativamente entre plantas saudáveis e infectadas com TuMV. Por outro

lado, o crescimento de *Lipaphis erysimi*, afídeo especialista, foi maior em plantas infectadas com TuMV quando comparadas às plantas sadias. Resultados semelhantes foram obtidos com isolados de TuMV dos grupos “World B” e “Basal-BR”, o que permitiu concluir que *L. erysimi* apresentou uma associação de mutualismo com TuMV mais evidente do que *M. persicae*, sendo que os diferentes grupos filogenéticos de TuMV não afetaram o crescimento desses afídeos em plantas de nabo (ADACHI et al., 2018).

De acordo com as análises do genoma completo dos cinco isolados de TuMV, assim como da CP completa dos demais isolados sequenciados no presente trabalho, verificou-se uma subdivisão nos grupos propostos por Oshima et al. (2002) e Gibbs et al. (2015). Nas análises filogenéticas da CP, a maioria dos isolados brasileiros formou um grupo monifolético sustentado por 100% de *bootstrap* no grupo “BR”. A formação desse grupamento de isolados brasileiros de TuMV no grupo “BR”, permitiu propor a formação de um subgrupo dentro do grupo “BR” que foi denominado ***Brazilian***, composto em sua maioria por isolados de TuMV de *Raphanus* coletados em municípios do Estado de São Paulo. Além disso, foi possível observar que isolados pertencentes ao grupo “BR” tem predominado nas áreas de cultivo de brássicas no Brasil. Resultados semelhantes foram obtidos, recentemente, na Coréia do Sul, quando ao analisarem 17 clones infecciosos de TuMV, a partir de isolados de rabanete, observou-se que o grupamento “Basal-BR” foi o que se estabeleceu nessa região (GONG et al., 2019).

No grupo “World-B”, houve uma tendência de agrupamento dos isolados de *B. rapa* e *B. oleracea*. Vale ressaltar que dois isolados brasileiros presentes nesse grupo, T31 e T06, foram capazes de infectar nabiça (*Raphanus raphanistrum*). Apesar desse grupo ser composto em sua maioria por isolados do patotipo (B), Oshima et al. (2002) não descartam a possibilidade de alguns isolados do patotipo (BR) também estarem alocados nesse grupo.

Assim como a CP, a CI também é considerada uma região genômica indicada para classificação filogenética de potyvírus (ICTV, 2018). Porém, apesar das análises filogenéticas da CI terem apresentado resultados similares às análises da CP, não foi possível observar a formação consistente das subdivisões dos grupamentos propostos por Oshima et al. (2012). Além disso, em ambas as análises (CP e CI), não foi possível separar os isolados de acordo com origem geográfica e/ou hospedeiro. A maioria dos isolados provenientes da mesma região geográfica e mesma hospedeira apresentaram variabilidade no genoma, confirmando a diversidade genética dos isolados brasileiros de TuMV.

Nas análises dos genomas (completos) dos cinco isolados de TuMV caracterizados neste trabalho, observou-se que a região correspondente à CP foi a que

apresentou maiores porcentagens de identidade e menor variabilidade. Observou-se, também, que a região N-terminal foi a mais variável, corroborando os dados de literatura (SHUKLA et al., 1994). Porém, a região correspondente à proteína P1 apresentou as menores porcentagens de identidade, por se tratar de uma região que apresenta elevada variabilidade como observado para outros isolados de TuMV (ZHENG et al., 2017).

Na região N-terminal da CP, constatou-se a presença do motivo DAG (ácido aspártico-alanina-glicina) conservado para os cinco isolados de TuMV, assim como na região correspondente à HC-Pro, também se confirmou a presença dos motivos KICT (lisina-isoleucina-treonina-cisteína) e PTK (prolina-treonina-lisina). Esses três motivos têm papel fundamental na transmissão do TuMV por afídeos vetores. O motivo KICT possibilita a ligação da HC-Pro ao receptor do estilete do afídeo, enquanto que o PTK intermedia a ligação HC-Pro com os motivos DAG presentes na CP das partículas virais (RACCAH et al., 2001). As interações (moleculares) desses motivos apresentam alta especificidade, ou seja, qualquer modificação nessas sequências conservadas de aminoácidos pode acarretar em perda da capacidade de transmissão do vírus (COSTA, 1998). A perda da capacidade de transmissão devido a substituições de aminoácidos em uma dessas sequências conservadas foi relatada para diversos potyvírus. A substituição de lisina por ácido-glutâmico no motivo TC causou a perda da transmissibilidade pelos afídeos vetores do tobacco vein mottling virus (TVMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) e potato virus Y (PVY) (ATREYA & PIRONE et al., 1993; COSTA 1998). Em uma estirpe de ZYMV, houve perda quase total da atividade da HC-Pro, quando a treonina (T) foi trocada por alanina (K) no domínio PTK (COSTA, 1998).

A proteína HC-Pro pode ser dividida em três regiões de acordo com suas funções. A região N-terminal está associada com a transmissão por afídeos, intermediada pelos motivos supracitados KICT e PTK. A região C-terminal tem atividade de protease, enquanto a região central da molécula responde pelas demais atividades da proteína. Observou-se também que os motivos FRNK (fenilalanina-arginina-asparagina-lisina), CCCVT (cisteína-cisteína-cisteína-valina-treonina) e ING (isoleucina-glicina-asparagina) se mantiveram conservados. O motivo FRNK, encontrado apenas em potyvírus transmitidos por afídeos, está relacionado com expressão de sintomas nas hospedeiras. Em trabalhos envolvendo mutagênese sítio-dirigida na região genômica correspondente à HC-Pro do ZYMV, observou-se que a simples mudança de arginina (posição 180) por isoleucina diminuiu drasticamente a expressão dos sintomas e os danos causados em frutos de abóbora. Porém, em trabalhos realizados com o potyvírus Johnson grass mosaic virus (JGMV), a mudança dos aminoácidos fenilalanina e arginina por tirosina e lisina, respectivamente, foi associada à indução de sintomas mais severos do que os induzidos

pelo não mutante (GAL-ON, 2000). No presente trabalho, observou-se que este motivo (FRNK) se manteve conservado nos cinco isolados de TuMV analisados, indicando não estar associado com a severidade de sintomas observados nas hospedeiras analisadas. Com relação aos motivos CCVT e ING, associados com o movimento do vírus célula a célula e com replicação do genoma, respectivamente (PLISSON et al., 2003; MAIA & BERNARDI, 1996), também se mantiveram conservados nos cinco isolados.

Os sítios de clivagens pós-traducionais da poliproteína do TuMV se mantiveram, em sua maioria, conservados, o que está de acordo com a literatura (SHUKLA et al., 1994; ADAMS et al., 2012). Porém, observaram-se substituições nos sítios de clivagem entre as proteínas 6K₂ e VPg, onde ocorreu a mudança de serina (S) por asparagina (N), na região C-terminal da 6K₂. Houve também a substituição de fenilalanina (F) por tirosina (Y) entre as proteínas P1 e HC-Pro na região N-terminal da P1. Embora essas substituições sejam consideradas, relativamente, comuns em isolados de TuMV (dados compilados de sequências de TuMV do *Genbank*), chama à atenção para a de troca de fenilalanina (F), um aminoácido não polar, por tirosina (Y), aminoácido polar.

Os eventos de recombinação desempenham um papel importante na variabilidade e evolução dos vírus. Em estudos realizados por Oshima et al. (2007), com 92 sequências genômicas completas de isolados de TuMV, constataram-se 44 eventos de recombinação. Korkmaz et al. (2008), ao analisarem 97 sequências de isolados de TuMV, observaram que 47 eram recombinantes. A maioria das regiões recombinantes estava localizada nas proteínas P1, CI, 6K₂ e CP (ZHU et al., 2016). Esses autores constataram que os eventos de recombinação em isolados chineses de TuMV ocorreram, em sua maioria, entre as linhagens dos grupos “World B” e “Asian BR”. No presente trabalho, todos os isolados brasileiros de TuMV apresentaram eventos de recombinação consistentes na região genômica correspondente à proteína P1, além de outros eventos nas regiões genômicas correspondentes a HC-Pro, CP e CI.

Comprovou-se que os isolados brasileiros de TuMV apresentaram alta variabilidade baseada na identidade de nt e aa, que aliada à sua capacidade de infectar brássicas da vegetação espontânea, serem transmitidos eficientemente por afídeos polípagos e de contornar genes de resistência, evidenciam seu potencial genético e epidemiológico em causar prejuízos em espécies de brássicas cultivadas no Brasil.

7 CONCLUSÕES

- O turnip mosaic virus (TuMV) predomina em cultivos de brássica no Brasil. Além disso, coinfeções (mistas e triplas) com o cole latent virus (CoLV) e cauliflower mosaic virus (CaMV) foram observadas no levantamento realizado neste trabalho;

- O patotipo 1 do TuMV predomina no Brasil;

- Alguns isolados brasileiros de TuMV se comportaram como variantes do patotipo 1, o que indica a necessidade de uma revisão e adequação da classificação dos patotipos sugeridos até o momento;

- Observou-se, entre os cinco isolados brasileiros de TuMV selecionados para a caracterização biológica, uma variabilidade na indução de sintomas em plantas indicadoras e nas variedades de *Brassica* e *Raphanus* comerciais e da vegetação espontânea, sendo T31 e T48 os que induziram sintomas mais severos;

- *Brevicoryne brassicae* (monófago/especialista), espécie de afídeo que coloniza brássicas, apresentou baixa eficiência de transmissão do TuMV nas simulações experimentais de transmissões primárias e secundárias;

- *Myzus persicae* (polífago/ generalista), espécie de afídeo que pode colonizar brássicas na ausência de outras hospedeiras, apresentou as maiores eficiências de transmissão nas simulações dos sistemas envolvendo a transmissão do TuMV de uma espécie da vegetação espontânea (nabiça, *Raphanus raphanistrum*) para uma variedade cultivada (mostarda, *Brassica rapa*) e vice-versa. Uma menor eficiência de transmissão do TuMV por esse afídeo foi observada de nabiça para nabiça, provavelmente devido à heterogeneidade das populações dessa espécie da vegetação espontânea;

- *Aphis fabae* (polífago/generalista), que não coloniza brássicas, foi mais eficiente na transmissão do TuMV na simulação de mostarda para mostarda (transmissão secundária), o que sugere que esse afídeo deve ter um papel importante na epidemiologia da virose;

- Na transmissão massal (cinco afídeos por planta), constatou-se que as três espécies de afídeos estudadas foram capazes de transmitir o TuMV, o que pode justificar eventualmente, o controle preventivo das populações de afídeos para minimizar a dispersão desse vírus no campo;

- Observou-se, com as análises filogenéticas da capa proteica (CP), que os isolados brasileiros de TuMV distribuíram-se em três grupos filogenéticos (“BR”, “World-B” e “Basal-B”), o que confirma a variabilidade genética desse vírus no Brasil. Porém, a maioria dos isolados brasileiros formou um clado no grupamento filogenético “BR”, indicando uma correlação com a origem geográfica, além da proposta de um subgrupo, denominado *Brazilian*;

- As análises filogenéticas das sequências completas dos genomas dos isolados brasileiros de TuMV reforçaram os resultados obtidos para a região genômica correspondente à CP, confirmando que há variabilidade genética;

- Todos os motivos conservados relacionados à transmissão do TuMV por afídeos, replicação das partículas virais e movimento célula a célula mantiveram-se conservados nos cinco isolados brasileiros de TuMV.

8 REFERÊNCIAS

- ACCARINI, J.H. et al. Hortícolas modernização necessária. **Agroanalysis**, v.20, p.41-46, 2000.
- ADACHI, S. et al. Effects of infection by Turnip mosaic virus on the population growth of generalist and specialist aphid vectors on turnip plants. **PLOS One**, v.13, p.1-8, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0200784.
- ADAMS, M.J. et al. *Potyviridae*. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Eds.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier Academic Press. 2012. p.1069-1089.
- AGBECI, M. et al. Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of *turnip mosaic virus*. **PLoS Pathogens**, v.9, p. 1-15, 2013. doi: 10.1371/journal.ppat.1003683.
- AGRIANUAL, 2017, 2015, 2013. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP.
- AGRIOS, G.N. Introduction. In: AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 4th ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.3-41.
- ALMEIDA, S. **Descrição da família Brassicaceae (Cruciferae)**. 2016. Disponível em < <http://knoww.net/cienterravida/biologia/brassicaceae-familia-cruciferae>>. Acesso em: 19 de julho de 2017.
- AMARAL, P.P.R.; RESENDE, R.O.; NAGATA, T. Biological and genomic characteristics of a potyvirus isolated from *Tropaeolum majus* in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v.6, p.151, 2001. (Abstract).
- ANDRET-LINK, P.; FUCHS, M. Transmission specificity of plant viruses by vectors. **Journal of Plant Pathology**, v.87, p.153-165, 2005.
- ANDREUCCETTI, C.; FERREIRA, M.D., TAVARES, M. Perfil de tomate de massa em supermercados da região de Campinas. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.148-151, 2005.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.18, p.1-20, 2016. doi: 10.1111/boj.12385
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS. Editora Gazeta Santa Cruz. Santa Cruz do Sul – RS. 2017. 92p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS (ABCSEM). 2016. **2º levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil**. Disponível em: < <http://www.abcsem.com.br>>. Acesso em: 9 de outubro de 2016.

ATIRI, G.I.; ENOBAKHARE, D.A.; THOTTAPPILLY, G. The importance of colonization and non-colonization aphid vectors in the spread of cowpea aphid-borne mosaic virus in cowpea. **Crop Protection**, v.5, p.406-410, 1986.

ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: Effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.90, p.11919–11923, 1993.

BAK, A. et al. Virus factories of cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage actively in vector transmission. **Journal of Virology**, v.87, p.12207–12215, 2013. doi: 10.1128/JVI.01883-13.

BARBOSA, C.J. et al. Identificação do vírus do mosaico do pepino e do mosaico do nabo em canola no Paraná. **Biotemas**, v.13, p.161-168, 2000. doi: 10.5007/%25x.

BARROS, F.C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v.26, p.231-239, 2010.

BELINTANI, P. et al. Evidence supporting the recognition of *Cole latent virus* as a distinct carlavirus. **Journal of Phytopathology**, v.150, p.330-333, 2002. doi: 10.1046/j.1439-0434.2002.00757.x.

BI, X.; GOSS, D.J. Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.17740-17746, 2000.

BLACKMAN, R.L. **Invertebrates types-Aphids**. Ginn e Co Ltda, London, 1974, p.1-175.

BLACKMAN, R.L.; EASTOP, V.F. **Additions and amendments to “Aphids on the World’s Plants”**. **Zootaxa**, v.2774, p.57-68, 2011. Disponível em: <<http://www.mapress.com/zootaxa/2011/f/zt02774p068.pdf>> Acesso em: 06 de março de 2018.

BLACKMAN, R.L.; EASTOP, V.F. **Aphids in the world’s crops. An identification and information guide**. John Wiley & Sons, New York, 2000, 476p.

BLACKMAN, R.L.; EASTOP, V.F. **Taxonomic issues**. In: VAN EMDEN, H.F.; HARRINGTON, R. (Eds.). *Aphids as crop pests*. CABI Publishing, Wallingford, p.1-29, 2007.

BLANC, S.; DRUCKER, M.; UZEST, M. Localizing viruses in their insect vectors. **Annual Review of Phytopathology**, v.52, p.403-425, 2014. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045920.

BLANC, S.; UZEST, M.; DRUCKER, M. New research horizons in vector- transmission of plant viroses. **Current Opinion in Microbiology**, v.14, p.483-491, 2011. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.008

BLANCO, R.B.F.; BLAT, S.F. Sistema de cultivo na produção de hortaliças. **Pesquisa e Tecnologia**, v.11, n.1, p.1-6, 2014.

BOARI, A.J. et al. Agrião d'água (*Nasturtium sativum*) naturalmente infectada por um potyvirus. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.200, 2002.

BORATYN, G. M. et al. A more efficient report with usability improvements. **Nucleic Acids Research**, v.41, p.29-33, 2013. doi: 10.1093/nar/gkt282.

BOS, L. New plant virus problems in developing countries: A corollary of agricultural modernisation. **Advances in Virus Research**, v.3, p.8:349–407, 1992.

BRAGARD, C. et al. Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission. **Annual Review of Phytopathology**, v.51, p.177-201, 2013. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102346.

BRANDES, E.W. Artificial an insect transmission of sugar cane mosaic. **Journal of Agriculture Research**, v.19, p.131-138, 1920.

BRAULT, V. et al. Aphids as transport devices for plant viroses. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, p.524-538, 2010. doi: 10.1016/j.crvi.2010.04.00.

BRUNT, A.A. et al. **Virus of Plants**. University Press, Cambridge, UK, 1997, 1451p.

CAMARGO FILHO, W.P.; CAMARGO, F.P; ALVES, H.S. Algumas sugestões para a expansão da agropecuária orgânica no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v.37, p.50-61, 2010.

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: 02 de agosto de 2016.

CAMARGO, A.M.M.M.P. de.; CAMARGO, F.P. CAMARGO FILHO, W.P. Distribuição geográfica da produção de hortaliças no estado de São Paulo: participação no país, concentração regional e evolução no período de1996-2006. **Informações Econômicas**, v.38, p.28-35, 2008.

CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno hospedeiro. *In*: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. v.1, p.86-92.

CARBONELL, A. et al. The Cucumber vein yellowing virus silencing suppressor P1b can functionally replace HCPro in Plum pox virus infection in a host-specific manner. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v.25, p.151–164, 2012. doi: 10.1094/MPMI-08-11-0216.

CARRINGTON, J.C.; DOUGHERTY, W.G. A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 85, p. 3391-3395, 1988.

CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' non translated region. **Journal of Virology**, v. 64, p. 1590-1597, 1990.

CARVALHO, P.G.B. et al. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.397-404, 2006.

CARVER, M.; GROSS, G.F.; WOODWARD, T.E. Hemiptera. **The Insects of Australia**, p.429-509, 1991.

CHANEY, R.L.; LEE, Y.M. Field Identification Guide to Aphids. **Quebec Vegetable Crops**, 1992.

CHAVES, A. L. R. et al. Interações das espécies de afídeos, cultivares de alface e ambiente na transmissão e disseminação do Lettuce mosaic virus. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador-BA. Fitopatologia Brasileira. Lavras-MG: **Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, 2006. v. 31. p. 311.

CHENG, F.; WU, J.; WANG, X. Genome triplication drove the diversification of Brassica plants. **Horticulture Research**, v.1, p.1-8, 2014. doi: :10.1038/hortres.2014.24.

CHUNG, B. Y. W. et al. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.5897-5902, 2008. doi: 10.1073/pnas.0800468105.

CHUNG, B.N. et al. Effects of temperature on systemic infection and symptoms expression of *Turnip mosaic virus* in Chinese cabbage (*Brassica campestris*). **The Plant Pathology Journal**, v. 31, p.363-370, 2015. doi: 10.5423/PPJ.NT.06.2015.0107.

CHUNG, H. et al. Construction of a genetic map based on high-throughput SNP genotyping and genetic mapping of a TuMV resistance locus in Brassica rapa. **Molecular Genetics and Genomics**, v.289, p.149-160, 2014.

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

CNA (2018). CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Agronegócio produz mais a preços menores em 2017**. Boletim PIB, 2017, 10p. Disponível em:<[http:// cnabrazil.org.br/boletins/boletim-pib-agronegocio-produz-mais-precos-menores-em-2017-dezembro-2017](http://cnabrazil.org.br/boletins/boletim-pib-agronegocio-produz-mais-precos-menores-em-2017-dezembro-2017)>. Acesso em: 28 de abril de 2018.

COELHO, K.S. **Perfil do consumidor de hortaliças frescas e processadas no município de Campos dos Goytacazes – RJ**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária – Universidade estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2007.

COLARICCIO, A. et al. Identificação dos tipos I e II do *Turnip mosaic virus* em couve através de hospedeiras diferenciadas. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.455-459, 2000.

COSTA, A.S. Amarelo do rabanete selvagem, moléstia causada por um vírus que infecta o rabanete cultivado e outras plantas. **Summa Phytopathologica**, v.6, p.28, 1980.

COSTA, A.S. Rabanete selvagem invasora de vegetação espontânea fonte de vírus de crucíferas. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.47, 1974.

COSTA, A.S. et al. A couve comum como fonte de 3 vírus que infectam crucíferas em São Paulo. **Revista Brasileira de Olericultura**, v.12, p.82, 1972.

COSTA, C., EASTOP, VF.; BLACKMAN, RL. Brasileiro Aphidoidea: I. Key to families, subfamilies and account of the Phylloxeridae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p.197-215, 1993.

COSTA, C.L. Vetores de vírus de plantas - I. Insetos. In: LUZ, W.C. (Ed). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.103-171, 1998.

COSTA, H. et al. First report of *Turnip mosaic virus* on watercress in Brazil. **Plant Disease**, v. 94, p. 1066, 2010. doi: 10.1094/PDIS-94-8-1066^a.

COTTON, S. et al. Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. **Journal of Virology**, v.83, p.10460–10471, 2009. doi: 10.1128/JVI.00819-09.

COUTO, F.D.A. A sociedade de olericultura do Brasil e o desenvolvimento da pesquisa em hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.15, p.213-215, 1997.

CUI, X et al. The C-terminal region of the Turnip mosaic virus P3 protein is essential for viral infection via targeting P3 to the viral replication complex. **Virology**, v.510, p.147-155, 2017. doi: dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.016

CUPERTINO, F.P.; KITAJIMA, W.E.; COSTA, C.L. Mosaico da couve flor em brócolis no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**. v.11, p. 394, 1986.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrates defense responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826-833, 2001.

DE ÁVILA A.C. et al. Caracterização de um isolado do vírus do mosaico do nabo de couve-manteiga (*Brassica oleraceae* var. *acephala*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 311-328, 1980.

DECROOCQ, V. et al. The determinant of potyvirus ability to overcome the RTM resistance of *Arabidopsis thaliana* maps to the N-terminal region of the coat protein. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, p.1302–1311, 2009. doi: 10.1094/MPMI-22-10-1302.

DEDRYVE, C.A.; RALEC, A.L.; FABRE, F. The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. **Biologies**, v.333, p.539-553, 2010. doi: 10.1016/j.crv.2010.03.009.

DIAZ-PENDON, J. A. et al. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 223-233, 2004.

DIXON, A.F.G. Aphid ecology: life cycles, polymorphism, and population regulation. **Annual Review of Ecology and Systematic**, v.8, p.329-353, 1977.

- DIXON, A.F.G. **Aphid ecology**. London: Chapman, p.257-264, 2009.
- DIXON, A.F.G.; KINDLMANN, P. Role of plant abundance in determining the abundance of herbivorous insects. **Oecologia**, v.83, p.281-283, 1990.
- DIXON, A.F.G. et al. Why there are so few species of aphids especially in the tropics. **American Naturalist**, v.129, p.580-592, 1987.
- DOLJA, V.V. et al. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. **The EMBO Journal**, v.13, p.1482–1491, 1994.
- DOLJA, V.V. et al. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distances movement of tobacco etch potyvirus. **Virology**, v. 206, p.1007–1016, 1995.
- DOUGHERTY, W.G.; PARKS, D. Post-translational processing of the tobacco etchvirus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. **Virology**, v.183, p.449-456, 1991.
- DUARTE, L.M.L. et al. First report of *Turnip mosaic virus* on *Trapaeolum majus* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v.96, p.603-611, 2014.
- DUFFUS, J.E.; LARSEN, R.C.; LIU, H.Y. Lettuce Infectious yellows virus – a new type of whitefly-transmitted virus. **Etiology**, v.76, p.97-100, 1986.
- EASTOP, V.F. **Worldwide importance of aphids as virus vector**. In: HARRIS, K.F.; MARAMOSCH, K. (Eds). *Aphids as Virus Vector*. New York: Academic Press, p.4-44, 1977.
- EASTOP, V.F., COSTA, C.L.; BLACKMAN, R.L. Brazilian Aphidoidea. III Sub-family Drepanosiphinae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p.1349-1355, 1993.
- EIRAS, M. et al. First Report of *Turnip mosaic virus* in horseradish in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.165, 2007.
- EIRAS, M.; DIANESE, E.C.; PEREIRA CARVALHO, R.C.; Resistência genética de plantas a vírus. In: DALLAGNOL, L.J. (Ed.) **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 2018. p.296-358. Disponível em: <<http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/prefix/4207>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2018.
- EMBRAPA (2017), EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **NASA confirma dados da Embrapa sobre área plantada no Brasil**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/30972114/nasa-confirma-dados-da-embrapa-sobre-area-plantada-no-brasil>>. Acesso em: 25 de abril de 2018.
- EVERTSEN, J. A.: **Biological aspects of turnip mosaic virus in relation to the rape seed crop in southern Ontario**. MS thesis, Univ. Guelph, Ontario, Canada, 1974.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-19, 1998.

FERERES, A.; MORENO, A. Behavioural aspect influencing plant virus transmission by homopteran insect. **Virus Research**, v.141, p.158-168, 2009. doi: 10.1016/j.virusres.2008.10.020.

FERREIRA, M.A. Um mercado fértil para o Brasil. **Frutas e Legumes**, v.1, p.8-10, 2000.

FERREIRA, W.R.; RANAL, N. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Brassica chinensis* L. var. *parachinenses* (bailey) sisnkaja (couve da malasia). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p. 353-361, 1999.

FIGUEIREDO, G. **Panorama da produção em ambiente protegido**. 2011. Disponível em: <<http://www.asbraer.org.br/arquivos/bibl/56-ca-producao.pdf>>. Acesso em: 03 de julho de 2017.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças**. p. 1-402. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 402p. 2000.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. UFV. 402p. 2008.

FUJISAWA, I. Turnip mosaic virus strains in cruciferous crops in Japan. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.23, p.289-293, 1990.

FUJISAWA, I. Aphid transmission of Turnip mosaic virus and Cucumber mosaic virus 2. Transmission from virus mixtures. **Annals of the Phytopathology Society of Japan**, v.51, p. 562-568, 1985.

GABOARDI-JUNIOR, A. **A importância da produção na agricultura familiar para a segurança alimentar**. Disponível em: <<http://www.jornadaquestaoagraria.ufpr.br/trabalhos/uploads/trabalho2ujornada.pdf>>. Acesso em 04 de julho de 2017.

GALLIE, D.R. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. **Gene**, v.216, p.1-11, 1998.

GAL-ON, A. A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. **Phytopathology**, v. 90, p.467-473, 2000. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.5.467.

GARCÊZ, R.M. et al. Survey of aphid population in a yellow passion fruit crop and its relationship on the spread Cowpea aphid-borne mosaic virus in a subtropical region of Brazil. **SpringerPlus**, v.537, p. 1-12, 2015. doi: 10.1186/s40064-015-1263-5.

GARCIA-RUIZ, H. et al. *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip mosaic virus infection. **The Plant Cell**, v.22, p.481-496, 2010. doi: 10.1105/tpc.109.073056.

GASPAR, J.O. et al. A degenerate primer allows amplification of part of the 3-terminus of three distinct carlavirus species. **Journal of Virological Methods**, v.148, p.283-285, 2008. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.11.005.

GIBBS, A.J.; NGUYEN, H.D.; OSHIMA, K. The ‘emergence’ of *turnip mosaic virus* was probably a ‘gene-for-quasi-gene’ event. **Current Opinion in Virology**, v.10, p.20-26, 2015. doi: 10.1016/j.coviro.2014.12.004.

GODFREY, L.D.; ROSENHEIM, J.A.; GOODELL, P.B. Cotton aphid emerges as major pest in SJV cotton. **California Agriculture**, v. 54, p. 26-29, 2000. doi: 10.3733/ca.v054n06p26.

GOMES, G.P. et al. Registro e proteção de olerícolas no Brasil, período de 1998 a 2014. **Horticultura Brasileira**, v.34, p.19-26, 2016.

GONG, J. et al. Sequence variations among seventeen new radish isolates of turnip mosaic virus showing differential pathogenicity and infectivity in *Nicotiana benthamiana*, *Brassica rapa*, and *Raphanus sativus*. **Phytopathology**, 2019 (*online first*). DOI: org/10.1094/PHYTO-12-17-0401-R.

GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v.29, p. 644-652, 2011. doi: 10.1038/nbt.1883.

GRANDE, L. et al. O cultivo protegido de hortaliças em Uberlândia. **Horticultura Brasileira**, v.21, p.241-244, 2003.

GRANGEON, R.; COTTON, S.; LALIBERTÉ, J.F. A model for the biogenesis of turnip mosaic virus replication factors. **Communicative & Integrative Biology**, v.3, p.363-365, 2010.

GRANGEON, R. et al. 6K₂-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. **Frontiers in Microbiology**, v.4, p.351, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.0035.

GREEN, S.K.; DENG, T.C. Turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts in Taiwan. **Plant Disease**, v.69, p.27-31, 1985.

GUEDES, I.M.R. **Uso do plástico na agricultura protegida**. 2015. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3230175/uso-do-plastico-na-agricultura-protegida>>. Acesso em: 4 de junho de 2017.

GUERRET, M.G.C. et al. Biological and molecular properties of Turnip mosaic virus (TuMV) strain breaks TuMV resistance in *Brassica napus*. **Plant Disease**, v.101, p. 674-683, 2017. doi:10.1094/PDIS-08-16-1129-RE.

GUTIERREZ, S. et al. Plant feeding by insects vectors can affect life cycle, population genetics and evolution of plant virus. **Functional Ecology**, v. 27, p.610-622, 2013. doi: 10.1111/1365-2435.12070.

GUTIERREZ, S. et al.; MICHALAKIS, Y.; BLANK, S. Circulating virus load determines the size of bottlenecks in viral populations progressing within a host. **PLoS Pathogens**, v.8, p.1-10, 2012. doi: 10.1371/journal.ppat.1003009.

HA, C. et al. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. **Archives of Virology**, v.153, p.25-36, 2008. doi: 10.1007/s00705-007-1053-7.

HANCOCK, J.F. **Plant Evolution and the Origin of Crop Species**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 269, 1992.

HARRIS, K. F. **Leafhoppers and aphids as biological vectors: vector-virus relationships**. In: HARRIS, K. F.; MARAMOROSCH, K. (Ed.). *Leafhopper vectors and plant disease agents*. New York: Academic Press, p. 217-308, 1979.

HERBELÊ, A.L.O. et al. Agricultura familiar e pesquisa agropecuária: contribuição para uma agenda de futuro. In: DELGADO, G.C.; BERGAMASCO, S.M.P.P.(Ed.). **Agricultura familiar brasileira: desafios e perspectiva de futuro**. Brasília: Secretaria Especial de Agricultura Familiar e do Desenvolvimento Agrário. 2017. p.133.

HIPPER, C. et al. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. **Frontiers in Plant Science**, v.4, p.154, 2013. doi: 10.3389/fpls.2013.00154.

HOFFMANN, M.H. Biogeography of *Arabidopsis thaliana*. (L.) Heynh. (Brassicaceae). **Journal Biogeography**, v.29, p. 125-134, 2002.

HUANG, X.; MADAN, A. *CAP3*: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v.9, p.868-877, 1999.

HUGHES, S. et al. Genetic mapping of the novel Turnip mosaic virus resistance gene TuRB03 in *Brassica napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p.1169-1173, 2003.

HULL, R. **Plant Virology**. Great Britain, Academic Press, 2014. 1004p.

INCAPER, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência e Extensão rural. Histórico da olericultura, 2017. Disponível em <<http://www.incaper.es.gov.br>>. Acesso em 19 de junho de 2017.

ICTV, INTERNATIONAL COMMITTEE ON VIRUS TAXONOMY 2018. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 15 de novembro de 2018.

ILHARCO, F.A. **Equilíbrio Biológico de Afídeos**. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 1992.

INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. Distribuidor de vírus. **Revista Cultivar Hortalças e Frutas**, v.16, p.26-29, 2002.

IVANOV, K. I. et al. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. **Journal of General Virology**, v.95, p.1415-1429, 2014. doi: 10.1099/vir.0.064220-0.

JENNER, C.E. et al. Serotypic variation in turnip mosaic virus. **Plant Pathology**, v. 48, p. 101-108, 1999.

JENNER, C.E.; WALSH, J.A. Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. **Plant Pathology**, v.45, p.848-856, 1996.

JENNER, C.E. et al. A fitness cost for Turnip mosaic virus to overcome host resistance. **Virus Research**, v.86, p.1-6, 2002. doi: 10.1016/S0168-1702(02)00031-X.

JIN, M. et al. Identification and mapping of a novel dominant resistance gene, TuRB07 to Turnip mosaic virus in Brassica rapa. **Theoretical and Applied Genetics**, v.127, p.509-519, 2014.

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.

JONES, R.A.C. Control of plant virus diseases. **Advances in Virus Research**, v.67, p.205-244, 2006. doi: 10.1016/S0065-3527(06)67006-1

JUNQUEIRA A.H.; LUENGO, R.F.A. Mercado diferenciados de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.95-99, 2000.

JUNQUEIRA, A.H. Tendências e desafios da distribuição de produtos hortícolas no Brasil. **Revista de Preços Agrícolas**, v.14, p. 5-11, 1999.

KADER, A.A.; PERKINS-VEAZIE, P.; LESTER, G.E. Nutritional quality of fruits, nuts and vegetables and their importance in human health, 2001. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov>>. Acesso em: 23 de junho de 2017.

KAMITANI, M. et al. A Survey on Plant Viruses in Natural Brassicaceae Communities Using RNA-Seq. **Microbial Ecology**, publicado online. p. 1-9, 2018. doi:10.1007/s00248-018-1271-4.

KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HCPro. **Virology**, v.285, p.71–81, 2001. doi: 10.1006/viro.2001.090.

KENNEDY, J.; SBOOTH, C.O.; KERSHAW, W.J.S. Host finding by aphids in the field. **Annals of Applied Biology**, v.49, p.1-21, 1961.

KENNEDY, J.S.; DAY, M.F.; EASTOP, V.F. **A conspectus of aphids as vectors of plant viruses**, London, Commonwealth Institute of Entomology, 1962.

KERSCH-BECKER, M.F.; THALER, J.S. Virus strains differentially induce plant susceptibility to aphid vectors and chewing herbivores. **Oecologia**, V.174, p.883–892, 2014. doi: 10.1007/s00442- 013-2812-7.

KHAN, M.A.; GOSS, D.J. Poly(A)-binding protein increases the binding affinity and kinetic rates of interaction of viral protein linked to genome with translation initiation factors eIFiso4F and eIFiso4fFB complex. **Biochemistry**, v. 51, p. 1388-1395, 2012. doi: 10.1021/bi201929h.

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant virus in fresh preparation. **Journal of Electron Microscopy**, v.14, p.119-121, 1965.

KITAJIMA, E.W. **Lista comentada de vírus de plantas descritos no Brasil (1911-2013)**. 2015. Disponível em: <http://www.sbv.org.br/site/downs/virus/Lista_comentada_2011_2013.pdf>. Acesso em: 02 de maio de 2018.

KITAJIMA, E.W.; CAMAROGO, I.J.B.; COSTA, A.S. Morfologia e aspectos intracelulares do vírus latente da couve. **Bragantia**, v.29, p. 181-195. 1970.

KITAJIMA, E.W. et al. Lista comentada de vírus e organismos do tipo micoplasma em plantas cultivadas e silvestres do estado do Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.607-625, 1984.

KOONIN, E.V., BOYKO, V.P.; DOLJA, V.V. Small cysteine-rich proteins of different groups of plant RNA viruses are related to different families of nucleic acid binding proteins. **Virology**, v.181, p.395-398, 1991.

KORKMAZ, S. et al. Occurrence and molecular characterization of Turkish isolates of *Turnip mosaic virus*. **Plant Pathology**, v.57, p. 1155-1162, 2008. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01902.x.

KRIZEK, B.A. et al. Developing transgenic Arabidopsis plants to be metal specific bioindicators. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, p.175-181, 2003.

KRUCKELMANN, H. W.; SEYFFERT, W. Interactions between a *Turnip mosaic virus* and the genotype of the host. **Theoretical and Applied Genetics**, v.40, p.121-123, 1970.

LI, G. et al. Variability in eukaryotic initiation factor iso4E in *Brassica rapa* influences interactions with the viral protein linked to the genome of *Turnip mosaic virus*. **Scientific Reports**, v.8, p.1-11, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-31739-1.

LI, L. et al. Seed-borne viral dsRNA elements in three cultivated Raphanus and Brassica plants suggest three cryptoviruses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.62 p.287–295, 2016. doi: 10.1139/cjm-2015-0788.

LI, Q.Y. et al. Identification and mapping of a novel Turnip mosaic virus resistance gene TuRBCS01 in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). **Plant Breeding**, v.134, p.221-225, 2014.

LIMA, M.L.R.Z.C. et al. Incidência de viroses em plantações de olerícolas na região metropolitana de Curitiba. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.403, 1984. (Abstract).

LIU, J. et al. Identification of the TuNI gene causing systemic necrosis in Arabidopsis ecotype Ler infected with Turnip mosaic virus and characterization of its expression. **Journal of General Plant Pathology**, v.81, p.180-191, 2015.

LÓPEZ-MOYA, J.J. et al. Detection of Cauliflower mosaic virus (CaMV) in single aphids by polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Virological Methods**, v.37, p.129-138, 1992.

LÓPEZ-MOYA, J.J.; GARCIA, J.A. Potyviruses. **Enciclopedia of Virology**, v.4, p.313-322, 2008.

LORENZI, H. **Platas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 4ªed. Nova Odessa: Instituto Platanum de Estudos de Flora LTDA, 2008.

LOURENZANI, A.E.B.S.; SILVA, A.L. Estudo da competitividade dos diferentes canais de distribuição de hortaliças. **Gestão e Produção**, v.11, p.385-398, 2004.

LOWERY, D.T.; SEAR, M.K.; HARMER, C.S. Control of turnip mosaic virus of rutabaga with application of oil, whitewash and insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.83, p.2352-2356, 1990.

MACEDO, A. Agricultura familiar e a difusão conceitual do termo. **Hortaliças em Revistas**, v.15, Capa, 2014.

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

MAIA, I.G.; BERNARDI, F. Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed *Potato virus Y* helper component-proteinase. **Journal of General Virology**, v.77, p.869–877 1996.

MANDADI, K. K.; SCHOLTHOF, K. B. G. Plant immune response against viruses: how does a virus cause disease? **The Plant Cell**, v. 25, p. 1489-1505, 2013.

MAPA (2007). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 de maio de 2016.

MARTIN, D.P. et al. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, v.26, p.2462-2463, 2010.

MARTINIERE, A. et al. A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. **eLife**, v.2, p.1-26, 2013. doi: 10.7554/eLife.00183.00.

MARUBAYASHI, J.M.; YUKI, V.A.; WUTKE, E.B. Transmissão do Cowpea mild mottle virus pela mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B para plantas de feijão e soja. **Summa Phytopathologica**, v.36, p.158-160, 2010.

MAUCK, K.E.; CONSUELO, M.D.M.; MARK, C.M. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v.107, p3600–3605, 2010. doi: 10.1073/pnas.0907191107.

MAY, R.M.; ANDERSON, R.M. Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. **Proceedings of Royal Society of London**, v.219, p.281-313, 1983.

MCDONALD, J.G.; HIEBERT, J.G. Characterization of capsid a cylindrical inclusion proteins of three strain of turnip mosaic virus. **Virology**, v.63, p.295-303, 1975.

MEDEIROS, R.B. Replicação, organização e expressão gênica. In: MEDEIROS, R.B.; RESENDE, R.O.; CARVALHO, R.C.P.; DIANESE, E.; COSTA, C.L.; SGRO, J.Y. **Virologia Vegetal: conceitos, fundamentos, classificação e controle**. 1th ed. Editora UNB - Brasília, 2015. p.219-254.

MEINKE, D.W. et al. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. **Science**, v. 282, p.662-682, 1998.

MELO, P.C.T. **Panorama atual da cadeia de produção de hortaliças no Brasil**. Palestra proferida na 6ª Reunião Ordinária da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Hortaliças – CNPA/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, DF. 2006.

MELO, P.C.T.; MELO, A.M.T. Olericultura brasileira: do descobrimento ao século XXI. **Associação Portuguesa de Horticultura**, v.119, p.22-27, 2016.

MELO, P.C.T.; VILELA, N.J. Importância da cadeia produtiva de hortaliças, 2007). Disponível em: < http://www.abhorticultura.com.br/downloads/cadeia_produtiva.pdf>. Acesso em: 22 de junho de 2017.

MINAMI, K. Os rumos da Olericultura. **Revista-Preços Agrícolas**, 26p., 1999.

MIYAZAKI, M. **Morphology of Aphids** In: MINKS, A.K.; HAWERWING, P. (Eds). *Aphids, their Biology. Natural Enemies and Control*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, v.2A, p.299-313, 1987.

MORENO, A. et al. Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. **Journal of General Virology**, v.93, p.662-667, 2011.

MORETTI, C.L. Processamento mínimo de hortaliças alternativas viável para a redução de perdas pós-colheita e agregação de valor ao agronegócio brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v.17, Contra-cap, 1999.

MUELLER, E.E., GROVES, R.L., GRATTON, C. Crop and non-crop plants as potential reservoir hosts of alfalfa mosaic virus and cucumber mosaic virus for spread to commercial snap bean. **Plant Disease**, v.96, p.506–514, 2011. Doi: 10.1094/PDIS-02-11-0089.

MÜLLER, M. M.L.; CECCON, G.; ROSOLEM, C.A. Influência da compactação do solo em subsuperfície sobre o crescimento aéreo e radicular de plantas de adubação verde de inverno. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.25, p.531-538, 2001.

MURPHY, J.F. et al. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. **Virology**, v. 220, p. 535- 538, 1996.

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

NASS, L.L. et al. **Recursos Genéticos de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, 1.183p.

NETO, S.S. et al. **Manual de Ecologia dos Insetos**. Piracicaba – São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419p.

NG J.C.K., PERRY K.L. Transmission of plant viruses by aphid vectors. **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.505–511, 2004. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x.

NGUYEN, H.D. et al. *Turnip mosaic virus* probably first spread to Euroasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. **Plos One**, v.6, p.1-12, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0055336.

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

NICAISE, V. et al. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1272-1282, 2003.

NISHI Y. Study on the transmission of plant viruses by aphids. **Bull Kyushu Agric Exp Sta.** v.8 p.355– 356, 1963.

NUNES, T.C.F. **Avaliação dos efeitos da radiação gama em vegetais da espécie *Brassica oleracea* minimamente processados.** 2009. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de tecnologia nuclear) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

NYALUGWE, E.P.; BARBETTI, M.J.; JONES, R.A.C. Studies on resistance phenotypes to Turnip mosaic virus in five species of Brassicaceae, and identification of a virus resistance gene in *Brassica juncea*. **European Journal of Plant Pathology**, v.141, p.647-666, 2014.

NYALUGWE, E.P. et al. Biological and molecular variation amongst Australian Turnip mosaic virus isolates. **Plant Pathology**, v.64, p. 215-223, 2015. doi: 10.1111/ppa.12348.

OSHIMA et a., Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. **Journal of General Virology**, v.88, p.298-315, 2007. doi: 10.1099/vir.0.82335-0.

OSHIMA, K. et al. Molecular evolution of *turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. **Journal of General Virology**, v.83, p.1511-1521, 2002. doi: 10.1099/0022-1317-83-6-1511.

OTULAK, K.; GARBACZEWSKA, G. Cell-to-cell movement of three genera (+) ss RNA plant viroses. **Acta Physiol Plant**, v.33, p.249–260, 2011. doi: 10.1007/s11738-010-0538-2.

PALACIOS, I. et al. *Cauliflower mosaic virus* is preferentially acquired from the phloem by aphids vector. **Journal of General Virology**, v. 83, p.3163-3171, 2002.

PANDEY, B.P.; MOHAN, J. Inhibition of turnip mosaic virus by plant extracts. **Indian Phytopathology**, v.39, p.489-491, 1986.

PAPPU, S.S. et al. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. **Journal of Virological Methods**, v.41, p.9-20, 1993.

PAULINO, F.F. **Avaliação dos componentes voláteis e atividades antioxidantes de *Eruca sativa* Mill., *Brassica rapa* L. e *Raphanus sativus* L. após processamento.** 2008, 219f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PECCOUND, J. et al. Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, p.474-487, 2010. doi: 10.1016/j.crvi.2010.03.004.

PELLETIER, J.; SONENBERG, N. Internal initiation of translation of eukaryotic RNA directed by a sequence derived from *Poliovirus* RNA. **Nature**, v.334, p.320-325, 1988.

PENG, H. et al. Turnip mosaic virus induces expression of the LRR II subfamily genes and regulates the salicylic acid signaling pathway in non-heading Chinese cabbage. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.82, p.64-72, 2013.

PEREIRA-CARVALHO, R. C.; COSTA, C. L. Controle de viroses de plantas. In: Medeiros RB, Resende RO, Pereira-Carvalho RC, Dianese EC, Costa LC, Sgro J-Y (Eds.) **Virologia Vegetal: Conceitos, fundamentos, classificação e controle**. Brasília: Editora UnB, 2015. p. 593-650.

PERONTI, A. L. B. G.; SOUSA-SILVA, C. R. Aphis (Hemiptera: Aphidoidea) of ornamental plants from São Carlos, São Paulo state, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v.50, p.137-144, 2002.

PIRONE, T. P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.227-247, 1996.

PLISSON, C. et al. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.23753-23761, 2003.

PONTIS, R. E. Turnip mosaic virus on annual stock in Argentina. **Plant Disease**, v.57, p.379-362, 1973.

PRENDEVILLE, H.R. et al. Virus infection in wild plant population are both frequent and often unapparent. **American Journal of Botany**, v.99, p.1033-2012, 2012. doi: 10.3732/ajb.1100509.

PROCHÁZKOVÁ, Z. Host range and symptom differences between isolates of Turnip mosaic virus obtained from *Sisymbrium loeselii*. **Biologia Plantarum (PRAHA)**, v.22, p.341-347, 1980.

PROVVIDENTI, R. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the people's republic of China for resistance of turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.105, p.571-573, 1980.

PUUSTINEN, P. et al. Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases. **Journal of Virology**, v.76, p.12703-12711 2002. doi: 10.1128/JVI.76.24.12703-12711.2002.

QIAN, W. et al. Mapping and candidate-gene screening of the novel *Turnip mosaic virus* resistance gene *retr02* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.126, p.179-188, 2013.

RABELLO, T. Processamento mínimo, lucro máximo. **Frutas e Legumes**, v.1, p.13-20, 1999.

- RACCAH, S. et al. (Eds). **Virus-Insect-Plant Interactions**, p.181-206, 2001.
- RAJAMAKI, M.L. et al. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous protein and suggest some P1 functions. **Virology**, v. 342, p. 88-101, 2005. doi: 10.1016/j.virol.2005.07.019.
- RAJAMÄKI, M. L.; VALKONEN, J. P. T. The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v.12, p.1074–1081, 1999.
- RAKOW, G. Species Origin and Economic Importance of Brassica. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v.54, p. 3-7, 2004. doi: 10.1007/978-3-662-06164-0_1.
- RANGLES, J.W.; PALUKAITIS, P.; DAVIES, C. Natural distribution, spread, and variation in the tobacco mosaic virus infecting *Nicotiana glauca* in Australia. **Annals of Applied Biology**, v. 98, p.109–119, 1981.
- RAYBOULD, A.F. et al. The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea*. **New Phytologist**, v.141, p.265-275, 1999.
- RESTREPO, M.A.; FREED, D.D.; CARRINGTON, J.C. Nuclear transport of plant potyviral proteins. **The Plant Cell**, v. 2, p. 987-988, 1990.
- RESTREPO-HARTWIG, M. A.; CARRINGTON, J. C. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. **Journal of Virology**, v. 68, p.2388–2397, 1994.
- REVERS, F.; GARCIA, J.A. Molecular Biology of Potyviruses. **Advances in Virus Research**, v.92, p.101-199, 2015. doi: 10.1016/bs.aivir.2014.11.006.
- RIBBANDS, C.R. The spread of *Myzus persicae* (Sulz) andf yellows viroses within a sugar beet crop. **Bulletin of Entomological Research**, v.54, p.267-283, 1963.
- RIBEIRO, C.S. Desidratação de hortaliças como alternativa de mercado. **Horticultura Brasileira**, v.14, 1996.
- RIBEIRO-JUNIOR, M.R. et al. Biological and molecular characterization of a basal Brassica/Raphanus *Turnip mosaic virus isolates* from *Eruca sativa*. **Tropical Plant Pathology**, v. online, p.1-5, 2017. doi: 10.1007/s40858-017-0207-8.
- RIBEIRO-JUNIOR, M.R. et al. First report of turnip mosaic virus naturally infecting lettuce and chard plants in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, published online, 2018. doi: 10.1007/s42161-018-0142-7.
- ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: A weal link in plant RNA virus infection. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 40-45, 2006.
- ROBERT, Y. **Aphids and their environment**. In: MINKS, A.K.; HAWERWING, P. (Eds). *Aphids, their Biology. Natural Enemies and Control*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, v. 2A, p.299-313, 1987.

RODRIGUES, F.A. et al. Ocorrência do vírus do mosaico do nabo (*Turnip mosaic virus*) em *Brassica carinata*. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.338, 1995 (abstract).

RODRIGUES, L.K. et al. *Turnip mosaic virus infecting brássicas in Brazil*. In: 5th Conference of the Internatinal Working Group on Legume and Vegetable Viruses. Haarlem, Holanda, Resumo número 8. 2015.

RODRIGUES et al. Epidemiological aspects of the transmission and management of cowpea aphid-borne mosaic virus in a passion fruit orchard. **Journal of Plant Pathology**, v.98, p.531-539, 2016. Doi: 10.4455/JPP.V98I3.037

RODRIGUES, P. A importância nutricional das hortaliças. **Hortaliças em Revista**, v.2, Capa, 2005. Disponível em <<https://www.embrapa.br>>. Acesso em: 21 de junho de 2017.

ROOSSINCK, M.J. Plant virus metagenomics: Biodiversity and ecology. **Annual Review of Genetics**, v.46, p.359-369, 2012. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155600.

RUSHOLME, R.L. **The genetic control of resistance to turnip mosaic virus (TuMV) in Brassica**. PhD Thesis, University of East Anglia, Norwich, 2000.

RUSHOLME, R.L. et al. Genetic control of broad-spectrum resistance to *Turnip mosaic virus* in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). **Journal of General Virology**, v.88, p.3177–3186, 2007.

SAKO, N. Loss of aphid transmissibility of *Turnip mosaic virus*. **Vector Relations**, v.70, p. 647-649, 1980.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. 2 ed. Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.

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

SATO, S.G. et al. Uma abordagem sobre a comercialização de hortaliças produzidas na região do alto tietê. **Informações Econômicas**, v.38, p.36-45, 2008.

SCHAAD, M. C.; LELLIS, A. D.; CARRINGTON, J. C. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. **Journal of Virology**, v.71, p.8624–8631, 1997.

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

SEVIK, M.A., DELIGOZ, I. The reaction of cabbage (*Brassica oleracea* L.) breeding lines against Turnip mosaic virus. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v.15, p. 111-119, 2016.

SHAHRAEEN, N.; FARZADFAR, S.; LESEMANN, D.E. Incidence of Viruses Infecting Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Iran. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.614-616, 2003.

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

SHUKLA, D.D. et al. The N termini of coat protein of potyviruses are surface located and N terminus contains the major virus-specific epitopes. **Journal of General Virology**, v.69, p.1497-508, 1988.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. Cambridge: Cambridge University Press. 1994, 516p.

SILVA, B.A.; SILVA, A.R.; PAGIUCA, L.G. Cultivo protegido em busca de mais eficiência produtiva. **Hortifruti Brasil**, v.132, Capa, 2014.

SILVA, L.A. et al. Transmissão experimental revela novos potenciais reservatórios do *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Summa Phytopathologica**, v.38, p.168-169, 2012.

SILVA, W.F. et al. Diagnóstico da produção de hortaliças na região metropolitana de Belo Horizonte. **Horticultura Brasileira**, v.33, p.368-372, 2015.

SIMON, J.C. et al. The influence of clone and morph on the parameters of intrinsic rate of increase in the cereal aphids *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v.58, p.211-220, 1991.

SMYTH, D. R. Origin of the cauliflower. **Current Biology**, v.5, p.361-363, 1995.

SONG, K., OSBORN, T.C.; WILLIAMS, P.H. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 3. Genome relationships in Brassica and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *campestris*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.12, p. 497-506, 1990. doi: 10.1007/BF00226159

SOUZA, R.A.M. **Mudanças no consumo e na distribuição de alimentos – O caso da distribuição de hortaliças na cidade de São Paulo**. 2005. 133 f. Dissertação (Mestrado em Economia) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2005.

SOUZA, R.A.M. et al. Comercialização hortícola: análises de alguns setores do mercado varejista de São Paulo. **Informações econômicas**, v.28, p.33-36, 1998.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica e sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum de estudos da Flora Ltda, Nova Odessa, SP. p.403-404, 2005.

SOUZA-SILVA, C.R.; ILHARCO, F.A. **Afídeos do Brasil e suas plantas hospedeiras**. São Carlos-SP, Editora da UFSCar. 85p. 1995.

SPAK, J. Effect of sinegrin on the efficiency of acquisition of Turnip mosaic virus by *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*. **Biologia Plantarum**, v.34, p.451-455, 1992.

SPENCE, N. J. et al. Economic impact of *Turnip mosaic virus*, *Cauliflower mosaic virus* and *Beet mosaic virus* in three Kenyan vegetables. **Plant Pathology**, v.56, p.317-323, 2007. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01498.x.

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.

SUEHIRO, N. et al. An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. **Journal of General Virology**, v.85, p.287-298, 2004. doi: 10.1099/vir.0.79825-0.

TACAHASHI, Y.; UYEDA, I. Restoration of the 3' end of potyvirus RNA derived from Poly(A)-deficient infectious cDNA clones, **Virology**, v.265, p.147-152, 1999.

TAMURA, M. Inhibition of turnip mosaic virus by the juice extracted from Japanese brack pine (*Pinus thunbergii* Parl.) **Annual Phytopathological Society of Japan**, v.35, p.260-264, 1969.

TATINENI, S.; FRENCH, R. The C-terminus of Wheat streak mosaic virus coat protein is involved in differential infection of wheat and maize through host-specific long-distance transport. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.27, p.150-162, 2014. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0272-R.

TATINENI, S.; VAN WINKLE, D. H.; FRENCH, R. The N-terminal region of Wheat streak mosaic virus coat protein is a host- and strain-specific long-distance transport factor. **Journal of Virology**, v.85, p.1718-1731, 2011. doi:10.1128/JVI.02044-10.

TOMLINSON, J.A. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables, **Annals of Applied Biology**, v.110, p.661-681, 1987.

TOMLINSON, J.A. Turnip mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of plant viruses* 8. UK: CMI/AAB, 1970.

TOMPKINS, C.M. Two mosaic diseases of annual stock. **Journal of Agricultural Research**, v.58, p.63-77, 1939.

TSUNECHIRO, A. et al. Valor da produção agropecuária do estado de São Paulo em 2006: estimativa preliminar. **Informações Econômicas**, v.36, p.5-76, 2006.

UZEST, M. et al. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.104, p.17959-17964, 2007. doi: 10.1073/pnas.0706608104.

VAN DEN HEUVEL, J.F.J.M. et al. The N114 terminal region of Luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and essential for virus persistence in the aphid. **Journal of Virology**, v.71, p.7258-7265, 1997.

VAUGHAN, J. G.; GEISSLER, A. **The New Oxford Book of Food Plants**. Oxford University Press, New York, 2009.

VIJAYAPALANI, P. et al. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3NPIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. **PLoS Pathogens**, v.8, p.e1002639, 2012. doi: 10.1371/journal.ppat.1002639.

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, p.71-89, 2000.

VILELA, N.J.; MACEDO, M.M.C. Fluxo de poder no agronegócio: o caso das hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.88-94, 2000.

WALKEY, D.G.A.; DANCE, M.C. The effect of oil spray on aphid transmission of turnip mosaic, beet yellow, bean common mosaic and bean yellow mosaic viruses. **Plant Disease Report**, v.63, p.877-881, 1979.

WALSH, J.A. Genetic control of immunity to turnip mosaic virus in winter oilseed rapa (*Brassica napus* spp. *oleifera*) and the effect of foreign isolates of the virus. **Annals of Applied Biology**, v.115, p.89-99, 1989.

WALSH, J.A. et al. Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of TuRB01. **Theoretical Applied Genetics**, v.99, p.1149–1154, 1999.

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

WALSH, J.A. et al. Different classes of resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa*. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.15-20, 2002.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for a sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell, 2007. 258p.

WAN, J. et al. Turnip mosaic virus Moves Systemically through Both Phloem and Xylem as Membrane-Associated Complexes. **Plant Physiology**, v.167, p.1374-1388, 2015. doi: 10.1104/pp.15.00097.

WATSON, M.A.; HEALY, M.J.R. the spread of beet yellows and beet mosaic viruses in the sugarbeet root crop. **Annals of Applied Biology**, v.40, p.189-183, 1953.

WEBSTER, C.G. et al. Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. **Journal of Virology**, v.92, p.1-15, 2018. doi: 10.1128/JVI.00432-18.

WEI, T. et al. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplast for plant potyvirus replication. **Journal of Virology**, v.84, p.799-809. 2010. doi: 10.1128/JVI.01824-09.

WEI, T.; WANG, A. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. **Journal of Virology**, v.82, p.12252–12264, 2008. doi: 10.1128/JVI.01329-08.

WHITFIELD, A.E.; BRYCE, W.F.; ROTENBERG, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. **Virology**, v.479-480, p.278-289, 2015. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.026.

WILLIAMS, I.S. et al. (Eds.), **Aphids as crop pests**. Wallingford, CAB International, p.69-85, 2007.

WILLS, A.B. A preliminary gene list in Brassica oleraceae. **Eucarpia Cruciferae News**, p.22-24, 1977.

WITTMANN, S. et al. Interaction of the viral protein genome linked [proteinase] of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. **Virology**, v. 234, p. 84-92, 1997.

YAHARA T.; OYAMA, K. Effects of virus infection on demographic traits of an agamospermous population of *Eupatorium chinense* (Asteraceae). **Oecologia**, v. 96 p.310–315, 1993.

YASAKA, R. et al. The timescale of emergence and spread of Turnip mosaic Potyvirus. **Scientific Reports**, v.7, p. 1-14, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-01934-7.

YOSHII, H. On the strain distribution of turnip mosaic virus. **Annals of the Phytopathology Society of Japan**, v.28, p.221-227, 1963.

ZHENG, G.H. et al. Occurrence of Turnip Mosaic Virus in *Phalaenopsis* sp. In China. **Journal of Plant Pathology**, v.99, p.703-706, 2017.

ZHU, F. et al. Molecular Characterization of the Complete Genome of Three Basal-BR Isolates of *Turnip mosaic virus* Infecting *Raphanus sativus* in China. **Molecular Sciences**, v.18, p. 1-13, 2016. Doi:10.3390/ijms17060888.

ZIEBELL, H. et al. Cucumber mosaic virus and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. **Scientific Reports**, v.1, p.187, 2012. doi: 10.1038/srep00187.

ZINK, F.W.; DUFFUS, J.E. Linkage of turnip mosaic virus susceptibility and downy mildew, *Brimia lactucae*, resistance in lettuce. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.95, p.420-422, 1970.

ANEXOS

ANEXO A - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) utilizando um único afídeo da espécie *Myzus persicae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	3	342.148892	114.049631	0.570	0.6550
Bloco	2	444.068150	222.034075	1.110	0.3890
Erro	6	1200.450583	200.075097		
Total corrigido	11	1986.667625			
CV (%)=	118.49				
Média Geral	11.9375000	Número de observações	12		

Tratamento	Média	Resultado do teste
Nabiça/Nabiça (Na/Na)	4.760000	a
Mostarda/Mostarda (Mo/Mo)	9.520000	a
Mostrada/Nabiça (Mo/Na)	14.426667	a
Nabiça/Mostrada (Na/Mo)	19.043333	a

ANEXO B - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) utilizando um único afídeo da espécie *Aphis fabae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	3	951.904825	317.301608	3.293	0.0997
Bloco	2	238.000017	119.000008	1.235	0.3554
erro	6	578.054450	96.342408		
Total corrigido	11	1767.959292			
CV (%)=	103.09				
Média Geral	9.5208333	Número de observações	12		

Tratamento	Média	Resultado do teste
Nabiça/Nabiça (Na/Na)	4.760000	ab
Mostarda/Mostarda (Mo/Mo)	23.803333	b
Mostrada/Nabiça (Mo/Na)	9.520000	ab
Nabiça/Mostrada (Na/Mo)	0.000000	a

ANEXO C - - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) utilizando um único afídeo da espécie *Brevicoryne brassicae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	3	135.945600	45.315200	1.600	0.2853
Bloco	2	237.904800	118.952400	4.200	0.0723
erro	6	169.932000	28.322000		
Total corrigido	11	543.782400			
CV (%)=	111.80				
Média Geral	4.7600000	Número de observações	12		

Tratamento	Média	Resultado do teste
Nabiça/Nabiça (Na/Na)	4.760000	a
Mostarda/Mostarda (Mo/Mo)	0.000000	a
Mostrada/Nabiça (Mo/Na)	9.520000	a
Nabiça/Mostrada (Na/Mo)	4.760000	a

ANEXO D - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) utilizando um e cinco afídeos da espécie *Myzus persicae* por planta e teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	1	1681.030817	1681.030817	12.742	0.0703
Bloco	2	268.048233	134.024117	1.016	0.4961
erro	2	263.859433	131.929717		
Total corrigido	5	2212.938483			
CV (%)=	43,74				
Média Geral	26.2583333	Número de observações		6	

Tratamento	Média	Resultado do teste
Um afídeo por planta	9.520000	a
Cinco afídeos por planta	42.996667	b

ANEXO E - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) utilizando um e cinco afídeos da espécie *Aphis fabae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	1	2177.034017	2177.034017	2.286	0.2697
Bloco	2	816.530633	408.265317	0.429	0.7000
erro	2	1905.047633	952.523817		
Total corrigido	5	4898.612283			
CV (%)=	72.02				
Média Geral	42.8516667	Número de observações		6	

Tratamento	Média	Resultado do teste
Um afídeo por planta	23.803333	a
Cinco afídeos por planta	61.900000	a

ANEXO F - Análise estatística da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV) utilizando um e cinco afídeos da espécie *Brevicoryne brassicae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	1	767.270417	767.270417	27.744	0.0342
Bloco	2	55.311233	27.655617	1.0009	0.5000
erro	2	55.311233	27.655617		
Total corrigido	5	877.892883			
CV (%)=	46.50				
Média Geral	11.3083333	Número de observações		6	

Tratamento	Média	Resultado do teste
Um afídeo por planta	0.000000	a
Cinco afídeos por planta	22.6166670	b

ANEXO G - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV), de mostarda para mostarda (Mo/Mo), utilizando um único afídeo das espécies *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	2	861.242689	430.621344	4.748	0.0878
Bloco	2	317.365089	158.682544	1.750	0.2845
erro	4	362.743778	90.685944		
Total corrigido	8	1541.351556			
CV (%)=	85.73				
Média Geral	11.1077778	Número de observações		9	

Tratamento	Média	Resultado do teste
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0.000000	a
<i>Myzus persicae</i>	9.520000	ab
<i>Aphis fabae</i>	23.803333	b

ANEXO H - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV), de mostarda para nabiça (Mo/Na), utilizando um único afídeo das espécies *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	2	48.150756	24.075378	0.149	0.8658
Bloco	2	48.150756	24.075378	0.149	0.8658
Erro	4	644.272711	161.068178		
Total corrigido	8	740.574222			
CV (%)=	113.77				
Média Geral	11.1555556	Número de observações		9	

Tratamento	Média	Resultado do teste
<i>Brevicoryne brassicae</i>	9.520000	a
<i>Myzus persicae</i>	9.520000	a
<i>Aphis fabae</i>	14.426667	a

ANEXO I - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV), de nabiça para mostrada (Na/Mo), utilizando um único afídeo das espécies *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	2	589.319756	294.659878	1.529	0.3211
Bloco	2	317.333356	158.666678	0.823	0.5018
Erro	4	770.707511	192.676878		
Total corrigido	8	1677.360622			
CV (%)=	174.94				
Média Geral	7.9344444	Número de observações		9	

Tratamento	Média	Resultado do teste
<i>Brevicoryne brassicae</i>	4.760000	a
<i>Myzus persicae</i>	19.043333	a
<i>Aphis fabae</i>	0.000000	a

ANEXO J - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV), de nabiça para nabiça (Na/Na), utilizando um único afídeo das espécies *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	2	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000	0.000	1.0000
Bloco	2	135.945600	67.972800	1.000	0.4444
erro	4	271.891200	67.972800		
Total corrigido	8	407.836800			
CV (%)=	173.21				
Média Geral	4.7600000	Número de observações		9	

Tratamento	Média	Resultado do teste
<i>Brevicoryne brassicae</i>	4.760000	a
<i>Myzus persicae</i>	4.760000	a
<i>Aphis fabae</i>	4.760000	a

ANEXO K - Comparação da eficiência de transmissão do turnip mosaic virus (TuMV), de mostarda para mostrada (Mo/Mo), utilizando cinco afídeos das espécies *Myzus persicae*, *Aphis fabae* e *Brevicoryne brassicae* por planta. Teste de Tukey a 0,1%

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>FC
Tratamento	2	2315.860689	1157.930344	2.108	0.2370
Bloco	2	486.907822	243.453911	0.443	0.6701
erro	4	2197.091711	549.272928		
Total corrigido	8	4999.860222			
CV (%)=	55.14				
Média Geral	42.5044444	Número de observações		9	

Tratamento	Média	Resultado do teste
<i>Brevicoryne brassicae</i>	22.616667	a
<i>Myzus persicae</i>	42.996667	a
<i>Aphis fabae</i>	61.900000	a

ANEXO L - Eventos de recombinação que ocorreram entre os 41 isolados de turnip mosaic virus (TuMV) para as regiões genômicas correspondentes à capa proteica (CP) completa e inclusão citoplasmática cilíndrica (CI) parcial

Isolados	Parentais		Programas									Ponto de recombinação		Região genômica
	<i>Major</i>	<i>Minor</i>	RDP	GENECONV	BootScan	MaxChi	Chimaera	SiScan	PhylPro	LARD	3 seq	Começo	Final	
T60	T34	T21	-	-	-	2,03x10 ⁻⁴	6,23x10 ⁻³	1,41x10 ⁻⁵	-	-	-	24	239	CP
T82	T93	T46	-	8,41x10 ⁻³	-	5,31x10 ⁻⁷	6,01x10 ⁻⁴	1,89x10 ⁻¹²	-	-	3,68x10 ⁻²	30	444	CI