

**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**

**VIROMA ASSOCIADO AOS CULTIVOS DE BRÁSSICAS NO BRASIL:
CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS MAIS FREQUENTES**

AGATHA MOTA DE OLIVEIRA

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

SÃO PAULO

2023

AGATHA MOTA DE OLIVEIRA

**Viroma associado aos cultivos de brássicas no Brasil: caracterização dos
vírus mais frequentes**

Tese apresentada para o exame de qualificação de doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras
Co-orientador: Dr. Pedro Luis Ramos-González

SÃO PAULO

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Agatha Mota de Oliveira

Título: Viroma associado aos cultivos de brássicas no Brasil: caracterização dos vírus mais frequentes

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 Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 30/ 08/ 2023

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Eiras

Julgamento: _____

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: _____

Dra. Larissa Goulart Zanardo

Julgamento: _____

Instituição: Universidade Federal de Viçosa

Assinatura: _____

Dra. Renata Faier Calegario

Julgamento: _____

Instituição: Universidade Federal do Paraná

Assinatura: _____

Dr. Alexandre Levi Rodrigues Chaves

Julgamento: _____

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: _____

Dr. Ricardo Harakava

Julgamento: _____

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

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

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

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

À Dra. Katia Regiane Brunelli-Braga, pesquisadora da Sakata, por facilitar o acesso às propriedades comerciais onde foram realizadas as coletas de amostras de brássicas no cinturão verde de São Paulo, e por disponibilizar as variedades de brássicas e a câmara de crescimento que utilizamos nos experimentos de análises da influência da temperatura nas infecções pelo CoMMV.

Aos membros da Banca de Defesa desta tese de doutorado, pelas excelentes sugestões e correções apontadas para a melhoria deste trabalho.

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

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

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

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (Instituto Biológico): Maria Amélia Vaz Alexandre, Ligia Maria Lembo Duarte, Addolorata Colariccio, Alyne de Fátima Ramos, que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, e, principalmente, pela convivência, amizade, ensinamentos, e momentos de descontração.

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

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

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado (Proc. 19/06853-1) concedida (vinculada ao PDIp-FAPESP, proc. 17/50334-3), e pelos recursos dos projetos de auxílio regular à pesquisa (proc. 2014/22594-2 e 2015/50076-9) coordenados pelo Dr. Marcelo Eiras, que garantiram a realização deste trabalho.

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

RESUMO

OLIVEIRA, Agatha Mota de. **Viroma associado aos cultivos de brássicas no Brasil: caracterização dos vírus mais frequentes**. 2023. 113 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, 2023.

Os danos causados por vírus em brássicas cultivadas podem levar à desvalorização do produto final, principalmente em função dos sintomas que podem se manifestar nas folhas, inflorescências e raízes, dificultando ou inviabilizando a comercialização. Embora as brássicas tenham relevância para o Agro brasileiro, ainda há pouco conhecimento sobre a diversidade dos vírus que infectam essas hortaliças no Brasil. Este trabalho teve como objetivo realizar análises de viroma, identificar e caracterizar isolados coletados em campos de produção de brássicas, para explorar a diversidade dos vírus em cultivos de diferentes regiões do Brasil. Seis amostras de couve-de-folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*) infectadas, provenientes do Distrito Federal/DF, Goiás/GO, Paraná/PR e São Paulo/SP, e dois isolados provenientes dos municípios de Divinolândia, SP e Arapiraca, AL, denominados, respectivamente, T25 e T90, foram submetidas a extrações de RNA total, e encaminhados para sequenciamento de alto rendimento (*High-Throughput Sequencing* - HTS). Análises biológicas, sorológicas, moleculares e HTS dos isolados virais coletados permitiram avançar no conhecimento sobre os carlavírus que infectam brássicas, que incluiu o sequenciamento completo do genoma de um isolado do cole latent virus (CoLV), fornecendo suporte para seu status taxonômico. Além disso, caracterizou-se um novo carlavírus denominado cole mild mosaic virus (CoMMV). As análises das bibliotecas de HTS permitiram obter genomas completos de dois carlavírus, um polerovírus um waikavírus, além de fragmentos de caulimovírus, potyvírus e cytorhabdovírus. Após a identificação e caracterização dos isolados de brassica napus RNA virus 1 (BnRV1) e turnip yellows virus (TuYV), com o objetivo de se avaliar a incidência desses vírus, 72 amostras de brássicas coletadas no cinturão verde da cidade de São Paulo foram analisadas por meio de RT-PCR com *primers* específicos. Confirmou-se a presença do TuYV e do BnRV1, respectivamente, em 13 e 4% das amostras analisadas, além de coinfeções por esses vírus em outras três amostras. Coinfeções de quatro vírus (CoMMV, BnRV1, TuYV e turnip mosaic virus, TuMV) foram confirmadas em uma amostra de nabiça (*Raphanus raphanistrum*) com sintomas de mosaico e amarelecimento foliar. Neste trabalho, também foi realizada a avaliação da temperatura na infecção do CoMMV em brássicas (*B. rapa* e *B. oleracea*) por meio de dois experimentos com regimes de temperaturas diferentes conduzidos durante 30 dias: (1) 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 20°C; e (2) 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C. As avaliações foram semanais levando-se em conta: (i) altura das plantas; (ii) área foliar; (iii) número de folhas; (iv) peso fresco e seco das plantas; e (v) avaliação da expressão de sintomas. Os resultados obtidos permitiram constatar que em temperaturas mais elevadas (30°C) ambas as variedades de plantas (*B. oleracea* e *B. rapa*) inoculadas com o isolado de CoMMV foram mais susceptíveis à infecção viral, ocasionando um atraso ou diminuição no desenvolvimento da planta, enquanto em temperaturas mais baixas (20°C) as plantas suprimiram os possíveis efeitos causados pela infecção viral. As análises realizadas neste trabalho contribuíram para ampliar o conhecimento sobre a diversidade dos vírus que infectam brássicas no Brasil, e evidenciaram a ocorrência de coinfeções, que podem levar a efeitos sinérgicos, com aumento da severidade dos sintomas.

Palavras-chave: Brassicaceae, Fatores abióticos, Couve, Filogenia, HTS.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Agatha Mota de. **Virome associated with brassica crops in Brazil: characterization of the most frequent viruses.** 2023. 113 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, 2023.

The damage caused by viruses in cultivated brassicas can lead to crop losses mainly due to undesired symptoms in leaves, inflorescences, and roots, which encumber the commercialization of these fresh products. Although brassicas are relevant for Brazilian agriculture, there is little knowledge about the diversity of viruses that infect these vegetables in Brazil. This work aimed to perform virome analyses, identify and characterize isolates collected in brassica production fields to explore the diversity of viruses in crops from different regions of Brazil. Six samples of infected kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) from the Distrito Federal/DF, Goiás/GO, Paraná/PR and São Paulo/SP, and two isolates from the municipalities of Divinolândia, SP and Arapiraca, AL, called, respectively, T25 and T90, were subjected to total RNA extractions, which were sent for high-throughput sequencing (HTS). Biological, serological, molecular and HTS analyzes of the collected viral isolates allowed advancing knowledge about the carlaviruses that infect brassicas, which included the complete genome sequencing of a cole latent virus (CoLV) isolate, providing support for its taxonomic status. In addition, a new carlavirus named cole mild mosaic virus (CoMMV) was also characterized. Analyzes of HTS libraries confirmed the presence of complete genomes of two carlaviruses, a polerovirus and a waikavirus, in addition to the presence of fragments of caulimovirus, potyvirus and cytorhabdovirus. After the identification and partial characterization of brassica napus RNA virus 1 (BnRV1) and turnip yellows virus (TuYV) isolates, with the objective of evaluating the incidence of these viruses, 72 samples of brassica collected in the green belt of the city of São Paulo were analyzed by means of RT-PCR with specific primers. The presence of TuYV and BnRV1, respectively, was confirmed in 13 and 4% of the analyzed samples, in addition to coinfections with these viruses in three other samples. Coinfections of four viruses (CoMMV, BnRV1, TuYV and turnip mosaic virus, TuMV) were confirmed in a sample of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) with mosaic and leaf yellowing. In this work, the temperature was also evaluated through two experiments with different temperature regimes conducted during 30 days: (1) 12 hours of dark at 15°C and 12 hours of light at 20°C; and (2) 12 h dark at 15°C and 12 h light at 30°C. The results suggest that at higher temperatures (30°C) both variety of plants (*B. oleracea* and *B. rapa*) inoculated with the CoMMV isolate are more susceptible to viral infection, causing a delay or decrease in plant development, while at lower temperatures (20°C) the plants are able to suppress the possible effects caused by the viral infection. The analyzes carried out in this work contributed to increase knowledge about the diversity of viruses that infect brassicas in Brazil, and showed the occurrence of co-infections, which can lead to synergistic effects, with an increase in the severity of symptoms.

Keywords: Brassicaceae, Biotic stress, Kale, Phylogeny, HTS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 – (A) Corte ultrafino de folha de couve, proveniente de Pirenópolis (GO), apresentando inclusões citoplasmáticas típicas daquelas induzidas por carlavírus; (B) *Leaf-dip* da amostra de couve de Pirenópolis em que se observam partículas típicas de carlavírus; (C) Partícula flexuosa alongada com 610-700 nm de comprimento e 12-15 nm de diâmetro, com a representação das subunidades da proteína da capa (CP), em azul, envolvendo a fita simples de RNA; (D) Esquema da organização genômica dos carlavírus, indicando a posição de cada ORF. (Imagens: Dr. E.W. Kitajima, NAP-MEPA, ESALQ, USP). Parede celular (PC), mitocôndria (MT), cloroplasto (CL), inclusão citoplasmática (In). (Fonte: O Autor).....27
- FIGURA 2 - (A) Esquema da partícula isométrica de um caulimovírus. (B) Representação esquemática do DNA circular de fita dupla e a organização genômica dos caulimovírus. ORF 1/MP – movimento célula a célula; ORF 2/ATF e 3/VAP interação vírus-vetor, P2 liga-se ao receptor do afídeo e a P3 esta associada a partícula viral. ORF 4/CP – codifica a capa proteica; ORF 5/POL – replicação viral; ORF 6/TAV - tradução transativadora das ORF 1 a 5. (Fonte: O Autor).....30
- FIGURA 3 - (A) Esquema da partícula flexuosa alongada com cerca de 750 nm de comprimento. (B) Representação esquemática do RNA de fita simples e a organização genômica dos potyvírus. ORF única que codifica uma poliproteína que da origem as proteínas P1(protease da proteína 1), HC-Pro (componente auxiliar da protease), P3 (proteína 3), 6K1 (peptídio 1 de 6 kDa), CI (inclusão citoplasmática), 6K2 (peptídio 2 de 6 kDa), VPg (proteína do vírus ligada ao genoma), CP (capa proteica), NIa e NIb (proteína nuclear a e b); P3N-PIPO atua no movimento célula a célula (Fonte: O Autor).....32
- FIGURA 4 - (A) Esquema da partícula isométrica de um polerovírus. (B) Representação esquemática do RNA de fita simples e a organização genômica dos polerovírus P0 - atua como uma proteína supressora de silenciamento gênico; P1 - replicação viral, proteólise e ligação da VPg ao genoma viral; P1 e P2-- replicase (RNA polimerase dependente de RNA – RdRp). P3a - proteína de movimento; P3 - capa proteica; P4 - movimento célula a célula e via floema; P3 e P5 - interação vírus-vetor, desenvolvimento de sintomas e movimento via floema; P7 - regulação da ligação do genoma de RNA e interações planta-vetor. P6 – proteína com função desconhecida. (Fonte: O Autor).....35

FIGURA 5 - (A) Esquema de uma partícula isométrica de um waikavírus. (B) Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Waikavirus*. O RNA viral possui uma cauda poliadenilada ($A_{(n)}$) no terminal 3', uma proteína viral (VPg) ligada covalentemente ao terminal 5', e uma única ORF, que codifica uma poliproteína que, após ser clivada (processamento pós-traducional), origina as oito proteínas virais: proteína hipotética (P1); três proteínas da cápside (CP1, CP2, CP3), Helicase (Hel), VPg, 3C-like proteinase (Pro) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). (Fonte: O autor).....38

FIGURA 6 - Esquema ilustrativo do desenho experimental para avaliação do efeito da temperatura na expressão dos sintomas induzidos pelo cole mild mosaic virus (CoMMV) em plantas de couve-chinesa (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) e couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*).....58

FIGURA 7 - Organizações genômicas dos dois isolados (SP) de carlavírus: cole mild mosaic virus (CoMMV_T25) e cole latent virus (CoLV_T90). As caixas indicam a posição de cada ORF: **ORF 1**, codifica a replicase viral, proteína com 223 kDa com quatro domínios [metiltransferase (Mtr), *papain-like protease* (PPro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)]; **ORFs 2, 3 e 4**, formam o triplo bloco gênico (*Triple Gene Block*, TGB) que codificam proteínas associadas ao movimento do vírus célula a célula (MP); **ORF 5**, codifica a capa proteica (CP) do vírus; e **ORF 6** codifica uma proteína rica em cisteína (*RNA-Binding Protein*, RBP), com atividade associada à supressão de silenciamento gênico. As ORFs do terminal 3' são traduzidas por dois RNAs subgenômicos, sgRNA de 1,3 kb e 2,6 kb (que não são encapsulados).....61

FIGURA 8 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida a partir do alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos da ORF 5, que codifica a capa proteica (CP), de espécies da família *Betaflexiviridae* (subfamílias *Quinvirinae* e *Trivirinae*). Valores de suporte de *bootstrap* (1500 replicações) de ramos superiores a 70% são indicados perto dos nós correspondentes. Os isolados de cole latent virus e cole mild mosaic virus estão destacados em vermelho. Figura publicada no trabalho de OLIVEIRA et al. (2022).....65

FIGURA 9 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida a partir do alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos da ORF 1, que codifica a replicase (RdRp), de espécies da família *Betaflexiviridae* (subfamílias *Quinvirinae* e *Trivirinae*). Valores de suporte de *bootstrap* (1500 replicações) de ramos superiores a 70% são indicados perto

dos nós correspondentes. Os isolados de cole latent virus e cole mild mosaic virus estão destacados em vermelho. Figura publicada no trabalho de OLIVEIRA et al. (2022).....66

FIGURA 10 - Resultados da detecção do CoLV e CoMMV por RT-PCR utilizando *primers* para a porção genômica correspondente a capa proteica (CP). Eletroforese em gel de agarose dos amplicons 1,2% para detecção de CoLV- fragmento de 810 pb - (A) e CoMMV- fragmento de 669 pb - (B). Linhas 1-14: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 5. C +: folhas de couve infectadas. C-: couve-de-folha sadia. W: branco da reação. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 1 kb, Promega, EUA).....68

FIGURA 11 - Resultados da detecção do CoLV e CoMMV por RT-PCR utilizando *primers* para a porção genômica correspondente a replicase (RdRp). Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos amplicons para detecção de CoLV- fragmento de 486 pb - (A) e CoMMV- fragmento de 532 pb - (B). Linhas 1-14: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 5. C +: folhas de couve infectadas. C-: couve-de-folha sadia. W: branco da reação. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 1 kb, Promega, EUA).....68

FIGURA 12 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida a partir do alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos da Pro-Pol (Pro-proteinase, Pol-RNA polimerase dependente de RNA – RdRp) de espécies da família *Secoviridae*. O triângulo vermelho indica o isolado brasileiro de BnRV1 (brassica napus RNA virus 1 – Brasil-BR). Valores de suporte de *bootstrap* (1500 replicações) de ramos superiores a 50% são indicados perto dos nós correspondentes.....71

FIGURA 13 - Vista geral de uma área de produção comercial de repolho no município de Araucária, PR. Observa-se uma única planta exibindo sintoma de avermelhamento foliar. (2) Detalhe de uma planta de repolho var. “Esmeralda” infectada por um isolado brasileiro do turnip yellows virus (TuYV) com sintoma de avermelhamento das folhas baixas. (3) Área próxima do cultivo de repolho com elevada infestação de plantas de nabiça (*Raphanus raphanistrum*). (4) Detalhe de uma planta de nabiça com mosaico amarelo, sintoma característico induzido pelo TuYV.....72

FIGURA 14 – Amostras de folhas de brássicas com sintomas coletadas em campos de produção comercial do cinturão-verde de São Paulo. (A) Folha de nabiça (*Raphanus raphanistrum*) com mosaico, infectada com TuMV; (B) Folha de repolho (*Brassica*

oleracea var. *capitata*) com avermelhamento, infectada com TuYV; (C) Folha de repolho com clareamento de nervuras, com coinfeccção entre TuMV, BnRV1 e TuYV; (D) Folha de nabiça com mosaico e amarelecimento, infectada pelo TuYV; (E) e (F) Folhas de repolho com avermelhamento e clareamento de nervuras, respectivamente, infectadas com TuYV; (G) Folha de nabiça com mosaico, com coinfeccção entre TuMV e BnRV1; (H) Folha de nabiça com amarelecimento, com coinfeccção entre TuYV e BnRV1; (I) Folha de nabiça com mosaico e amarelecimento, infectada com TuYV, TuMV, BnRV1 e CoMMV; (J) Folha de brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) com amarelecimento, com coinfeccção entre CoMMV e TuYV.....73

FIGURA 15 - Amostras de brássicas coletadas em campos de produção do município de Ibiúna, SP. (A) Amostra A66: folha de nabiça (*Raphanus raphanistrum*) coinfectada pelo cole mild mosaic virus (CoMMV), turnip mosaic virus (TuMV), *Brassica napus* RNA virus 1 (BnRV1) e turnip yellows virus (TuYV) apresentando mosaico e amarelecimento; (B) Amostra A67: folha de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) infectada pelo CoMMV apresentando clareamento de nervuras, mosaico e amarelecimento.....74

FIGURA 16 - Resultados da detecção do cole latent virus (CoLV) por RT-PCR utilizando iniciadores para a porção genômica correspondente a replicase próxima ao terminal 3' (RdRp - RepC). Eletroforese dos amplicons em gel de agarose 1,2% para detecção de CoLV- fragmento de 486 pb. Linhas 1-31: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 7. C +: folhas de couve infectadas. C-: couve-de-folha sadia. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 100 pb, Promega, EUA).....76

FIGURA 17 - Resultados da detecção do cole mild mosaic virus (CoMMV) por RT-PCR utilizando iniciadores para a porção genômica correspondente a replicase próxima ao terminal '3 (RdRp - RepC). Eletroforese dos amplicons em gel de agarose 1,2% para detecção de CoMMV- fragmento de 532 pb. Linhas 1-31: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 7. C +: folhas de couve infectadas. C-: couve-de-folha sadia. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 100 pb, Promega, EUA).....76

FIGURA 18 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos amplicons para detecção do BnRV1 por RT-PCR utilizando *primers* para a porção genômica correspondente a (A) capa proteica (CP), fragmento de 380 pb; (B) Propol (Pro-proteinase, Pol-RNA polimerase

dependente de RNA – RdRp), fragmento de 988 pb. Linhas 3, 7, 8 e 9, 11 e 13 amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 8. C +: folhas de couve infectadas. C-: couve-de-folha sadia. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 100 pb, Promega, EUA).....78

FIGURA 19 – Resultados da detecção do TuYV por RT-PCR utilizando *primers* para a porção genômica correspondente a replicase (ORF3). Eletroforese dos amplicons em gel de agarose 1,2% para detecção de TuYV- fragmento de ~750 pb. Linhas 1-14: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 8. C +: folhas de couve infectadas. C-: couve-de-folha sadia. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 100 pb, Promega, EUA).....78

FIGURA 20 - (1) Vista geral de uma área de produção comercial de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) no município de Ibiúna, SP. Observa-se uma única planta exibindo sintoma de avermelhamento foliar. (2) Detalhe de uma planta de repolho infectada por um isolado brasileiro do turnip yellows virus (TuYV) com sintoma de avermelhamento das folhas baixas. (3) Área próxima do cultivo de repolho com elevada infestação de plantas de nabiça (*Raphanus raphanistrum*). (4) Detalhe de uma planta de nabiça com mosaico amarelo, sintoma característico induzido pelo TuYV.....79

FIGURA 21 - Efeito da temperatura (Experimento 1: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 20°C) no número de folhas de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25), . (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.....81

FIGURA 22 - Efeito da temperatura (Experimento 1: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 20°C) na altura de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25). (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença

estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.....81

FIGURA 23 - Efeito da temperatura (Experimento 1: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 20°C) na área foliar de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25), (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.....82

FIGURA 24 - Efeito da temperatura (Experimento 2: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C) no número de folhas de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25), (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.....83

FIGURA 25 - Efeito da temperatura (Experimento 2: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C) na altura de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25). (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.....83

FIGURA 26 - Efeito da temperatura (Experimento 2: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C) na área foliar de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25). (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b): sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²): com diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.....84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Relação das amostras de brássicas coletadas em diferentes Estados brasileiros.....	45
TABELA 2 – Relação de amostras coletadas em áreas do cinturão verde de São Paulo e de diferentes Estados brasileiros.....	46
TABELA 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização de RT-PCR para amplificação de fragmentos dos isolados de CoLV, CoMMV, BnRV1 e TuYV.....	53
TABELA 4 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre cole mild mosaic virus (CoMMV) isolado T25, cole latent virus (CoLV) isolado T90, isolado T107 (CoMMV) e isolado T110 (CoMMV), e de alguns vírus selecionados das subfamílias <i>Quinvirinae</i> e <i>Trivirinae</i> . Os maiores valores de porcentagens de identidade entre CoMMV e CoLV estão destacados em negrito e sublinhados.....	63
TABELA 5 – Amostras de brássicas provenientes de diferentes localizações geográficas e a identificação por meio de RT-PCR com <i>primers</i> específicos para o cole latent virus (CoLV) e cole mild mosaic virus (CoMMV).....	67
TABELA 6 - Porcentagem de identidade de aminoácidos entre o isolado brasileiro brassica napus RNA virus 1 (BnRV1 – Brasil - BR) e outros membros da família <i>Secoviridae</i>	70
TABELA 7 - Amostras de brássicas provenientes de diferentes localizações geográficas e a identificação por meio de RT-PCR com iniciadores específicos para a detecção de cole latent virus (CoLV) e cole mild mosaic virus (CoMMV).....	75
TABELA 8 - Amostras de brássicas coletadas nos municípios de Biritiba Mirim e Ibiúna (cinturão-verde) de São Paulo, e a identificação por meio de RT-PCR com <i>primers</i> específicos para o <i>Brassica napus</i> RNA virus 1 (BnRV1) e turnip yellows virus (TuYV).....	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Origem, importância econômica e social das brássicas.....	20
2.2. Análises de Viroma: revolucionando a virologia vegetal.....	22
2.2.1. CoLV e CoMMV (<i>Carlavirus</i>): classificação, propriedades biológicas e moleculares.....	26
2.2.2. CaMV (<i>Caulimovirus</i>): Classificação, propriedades biológicas e moleculares.....	29
2.2.3. TuMV (<i>Potyvirus</i>): Classificação, propriedades biológicas e moleculares.....	31
2.2.4. TuYV (<i>Polerovirus</i>): Classificação, propriedades biológicas e moleculares.....	33
2.2.5. BnRV1 (<i>Waikavirus</i>): Classificação, propriedades biológicas e moleculares.....	36
2.3. Viroses em brássicas: estratégias de manejo e controle.....	39
2.4. Influência das coinfeções e da temperatura sobre a replicação viral e os sintomas.....	41
3.OBJETIVOS.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1. Isolados virais.....	45
4.2. Preservação dos isolados.....	48
4.3. Obtenção de plantas para a realização dos testes biológicos.....	48
4.4. Inoculação mecânica.....	48
4.5. PTA-ELISA (Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent assay).....	49
4.6. Extração de RNA total.....	50
4.7. RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction).....	51
4.8. Sequenciamento automático de DNA.....	54
4.9. HTS (<i>High-Throughput Sequencing</i>) – Sequenciamento de alto rendimento, montagem e análises das sequências.....	54
4.10. Hibridização Dot-Blot.....	55
4.10.1. Síntese da sonda de DNA via PCR.....	55

4.10.2. Quantificação e desnaturalização do RNA.....	56
4.10.3. Pré-Hibridização e Hibridização.....	56
4.11. Avaliação do efeito da temperatura na infecção do CoMMV.....	57
5.RESULTADOS.....	59
5.1. Análise de viromas a partir do sequenciamento completo de alto rendimento (HTS).....	59
5.1.2. Sequenciamento e análises das sequências.....	60
5.1.3. BnRV1: Sequenciamento, análises das sequências e filogenia.....	69
5.1.4. TuYV: Sequenciamento, análises das sequências.....	71
5.2. Análises sorológicas (PTA-ELISA) e RT-PCR das amostras coletadas no cinturão verde da cidade de São Paulo.....	72
5.3. Testes biológicos: BnRV1 e TuYV.....	79
5.4. Avaliação dos testes de hibridização <i>dot-blot</i> para detecção da presença do BnRV1 nas amostras coletadas.....	80
5.5. Avaliação do efeito da temperatura na expressão de sintomas do CoMMV_T25.....	80
6.DISSCUSSÃO.....	85
7.CONCLUSÕES.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são uma ameaça para os sistemas agrícolas de todo o mundo, com estimativas de prejuízos econômicos que giram em torno de € 50 bilhões anuais (Pállas et al. 2018). Acredita-se que os impactos são ainda maiores quando envolvem viroses emergentes, que podem ser definidas como aquelas doenças causadas por vírus que apresentam um rápido aumento da incidência, da abrangência geográfica e/ou da patogenicidade (Rubio et al. 2020). Dos fatores que podem favorecer a emergência de um vírus, destacam-se: (i) a redução da diversidade genética (base genética estreita) dos hospedeiros, principalmente em sistemas agrícolas baseados em monocultivos; (ii) introdução de material vegetal de outras regiões, que pode favorecer a entrada de novos vírus (ou novas estirpes virais), hospedeiros e vetores em novos ambientes; e (iii) as altas taxas de mutação, recombinação e rearranjos, que permitem que os vírus evoluam e se adaptem a novos ambientes e hospedeiros (Eiras et al. 2018). É importante ressaltar que as estratégias de manejo e controle dos vírus de plantas devem ser otimizadas para cada patossistema (vírus-hospedeiro-vetor) e ambiente (Hull 2014; Jeger 2020). Enquanto para os vírus que infectam humanos e animais há uma corrida por vacinas e medicamentos, para os vírus de plantas, as estratégias de manejo e controle baseiam-se em prevenção, na tentativa de impedir o contato dos vírus com as plantas hospedeiras (entrada do patógeno na propriedade), ou na obtenção de plantas que sejam resistentes à infecção viral ou ao vetor (Eiras et al. 2018). A disseminação dos principais vírus de brássicas que ocorrem no Brasil é realizada por afídeos vetores (Rodrigues et al. 2021), sendo que as interações biológicas e moleculares vírus-vetor-hospedeira podem ser determinantes no sucesso da transmissão (Zhou et al. 2018).

As brássicas, denominação genérica de espécies botânicas pertencentes à família Brassicaceae (ex Cruciferae), são plantas de ciclo perene ou anual que apresentam uma grande variabilidade morfológica, sendo a maioria de porte herbáceo (Rimmer et al. 2007; Pakash et al. 2011). As hipóteses mais aceitas são de que as brássicas originaram-se no Mediterrâneo e Eurásia Ocidental (Hedge 1976; Gray 1982; Dixon 2006; Pakash et al. 2011). O rabanete (*Raphanus sativus*), muito provavelmente, se originou de ancestrais da nabiça (*Raphanus raphanistrum*) na região do Mediterrâneo e foi domesticado na Ásia antes do Império Romano (Kaneko & Matsuzawa 1993). Evidências arqueológicas e literárias com a integração de reconstruções filogenéticas e genética de populações sugerem que *Brassica cretica*, espécie selvagem endêmica do mar Egeu, parece ser o parente mais próximo das

variedades de *Brassica oleracea* cultivadas, reforçando a hipótese de que essas espécies se originaram na região do Mediterrâneo Oriental (Mabry et al. 2021).

Atualmente, as brássicas são cultivadas em todas as regiões agricultáveis do planeta. No Brasil, esses cultivos tiveram início com a chegada dos portugueses, que trouxeram variedades da Europa como brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*), couve-de-folha (*B. oleracea* var. *acephala*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-chinesa (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*), nabo, mostarda (*B. rapa*), rabanete, entre outras (Madeira et al. 2008; Camargo Filho & Camargo 2011). A produção brasileira de brássicas gira em torno de 200.000 toneladas, com uma receita bruta anual de mais de 50 milhões de dólares (Conab 2016). Os cinturões verdes dos municípios de São Paulo e Curitiba, juntamente com a região sul do Estado de Minas Gerais representam as regiões de cultivo de brássicas mais importantes do Brasil (Melo et al. 2019; IEA 2019).

Espécies e variedades cultivadas dos gêneros *Brassica* e *Raphanus* destacam-se na produção agrícola nacional (Melo et al. 2019). Porém, fatores como clima, baixa fertilidade dos solos, uso excessivo de agrotóxicos, sobreposição de cultivos, pragas (insetos e ácaros) e doenças causadas por bactérias, fitoplasmas, fungos, nematoides e vírus, podem influenciar a qualidade e o rendimento da produção (Carrizo & Rêgo 2000; Rimmer et al. 2007; Newbert 2016; Rodrigues et al. 2021; Oliveira et al. 2022). Os principais vírus descritos em brássicas no mundo são: cauliflower mosaic virus, CaMV (*Caulimovirus tessellobrassicae*, *Caulimoviridae*), cole latent virus, CoLV (*Cole latent virus*, *Carlavirus*, *Betaflexiviridae*), cucumber mosaic virus, CMV (*Cucumber mosaic virus*, *Cucumovirus*, *Bromoviridae*), radish mosaic virus, RaMV (*Comovirus raphani*, *Secoviridae*), ribgrass mosaic virus, RMV (*Ribgrass mosaic virus*, *Tobamovirus*, *Virgaviridae*), turnip crinkle virus, TCV (*Betacarmovirus brassicae*, *Tombusviridae*), turnip mosaic virus, TuMV (*Turnip mosaic virus*, *Potyvirus*, *Potyviridae*), turnip yellow mosaic virus, TYMV (*Tymovirus brassicae*, *Tymoviridae*), e turnip yellows virus, TuYV (*Turnip yellows virus*, *Polerovirus*, *Solemoviridae*) (Kitajima et al. 1970; Cupertino et al. 1986; Shattuck 1992b; Rimmer et al. 2007; Park & Hahn 2019; Greer et al. 2021; ICTV 2022; Oliveira et al. 2022).

Os danos causados por vírus em brássicas podem levar à desvalorização do produto final, principalmente em função dos sintomas que podem se manifestar nas folhas (couve-de-folha, mostarda e rúcula), nas inflorescências (couve-flor e brócolis), na formação da “cabeça” (couve-chinesa e repolho) e nas raízes (nabo, rabanete e raiz-forte), dificultando ou inviabilizando a comercialização (Shattuck 1992; Provvidenti 1996; Walsh et al. 2002;

Rimmer et al. 2007; Walsh et al. 2011; Newbert 2016; Rodrigues et al. 2019; Greer et al. 2021; Palukaitis & Kim 2021). Entretanto, alguns vírus que infectam brássicas parecem não causar sintomas severos ou, muitas vezes, sequer induzem sintomas perceptíveis como é o caso do CoLV. Além disso, o CoLV muitas vezes está associado a coinfeções com outros vírus, o que dificulta avaliar os níveis de danos e seu impacto econômico nos cultivos de brássicas (Mello et al. 1987; Gaspar et al. 2008; Eiras et al. 2008).

Ao longo de várias décadas, diversas técnicas de diagnóstico de doenças em plantas foram desenvolvidas. Inicialmente, o diagnóstico de vírus baseava-se na utilização de técnicas de cultura celular, testes biológicos, microscopia eletrônica, sorologia e sequenciamento de pequenos fragmentos de DNA (Brown 2001; Kapoor & Lipkin, 2014). A partir do desenvolvimento do sequenciamento de DNA, diversos métodos de sequenciamento começaram a ser desenvolvidos, sendo o principal deles o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*, NGS) que permitiu o sequenciamento de genomas completos (Brown 2001; Katsarou et al. 2019; Villamor et al. 2019; Chaudhari et al. 2023). Por meio de análises das bibliotecas genômicas geradas com o sequenciamento completo, um novo olhar pode ser lançado referente à diversidade dos vírus existentes nos campos de produção.

Devido ao destaque que as brássicas possuem no Agro brasileiro (Melo et al. 2019; IEA 2019), e ao pouco conhecimento disponível sobre a diversidade de vírus que infectam brássicas no Brasil, este trabalho teve como objetivo principal: identificar e caracterizar isolados a partir de coletas realizadas em campos de produção comercial de brássicas em diferentes regiões do Brasil. Neste trabalho, são apresentadas informações referentes à análise de viroma em cultivos de brássicas no Brasil por meio de análises de seis amostras de couve-de-folha infectadas coletadas no Distrito Federal/DF, Goiás/GO, Paraná/PR, e São Paulo/SP, no período de 2015 a 2022. Realizou-se também a identificação e caracterização de isolados de carlavírus coletados em cultivos comerciais de brássicas em diferentes regiões do Brasil. O genoma de um isolado do CoLV foi sequenciado, que corresponde à primeira sequência genômica completa obtida desse vírus (código de depósito no GenBank: MK770418). Além disso, um carlavírus novo foi caracterizado, incluindo o sequenciamento completo do seu genoma (código de depósito no GenBank: MK684348), sendo denominado cole mild mosaic virus (CoMMV). Além disso, identificou-se um isolado de CoMMV infectando plantas de nabiça (*R. raphanistrum*), uma planta daninha frequentemente

encontrada nos campos de produção de brássicas, e que parece ter um papel chave como reservatório desse (e de outros) vírus nos campos de produção de hortaliças.

Avaliou-se também o efeito da temperatura na indução de sintomas do CoMMV em duas espécies de brássicas. Observaram-se diferenças entre as coletas e temperatura avaliadas com relação ao número de folhas, altura das plantas, área foliar, peso seco, peso fresco e indução de sintomas. Foram também incluídas informações referentes à identificação e caracterização parcial de dois vírus recentemente detectados infectando brássicas no Brasil: o brassica napus RNA virus 1 (BnRV1, *Waikavirus*) e o turnip yellows virus (TuYV, *Polerovirus*). Foram obtidas sequências completas dos genomas de isolados desses vírus. O BnRV1 foi identificado em plantas de couve-chinesa provenientes do município de Bragança Paulista, SP, enquanto os isolados de TuYV foram coletados em plantas de repolho exibindo sintomas de avermelhamento das folhas baixas nos municípios de Araucária, PR, e Ibiúna, SP. Por se tratar do primeiro relato da ocorrência desses vírus no Brasil¹, um alerta se acendeu para que estratégias de manejo e controle sejam levadas em consideração na condução dos cultivos de brássicas. Vale ressaltar que o TuYV, transmitido por afídeos de modo circulativo (persistente), tem sido considerado um patógeno emergente em muitos outros países, por causar danos e perdas importantes em cultivos de brássicas (Newbert 2016; Greer et al. 2021). Após a identificação e caracterização parcial dos isolados de BnRV1 e TuYV, com o objetivo de se avaliar a incidência desses vírus, analisaram-se 72 amostras de brássicas coletadas no cinturão verde da cidade de São Paulo, por meio de RT-PCR com *primers* específicos para os dois vírus. Confirmou-se a presença do TuYV e do BnRV1, respectivamente, em 13 e 4% das amostras analisadas, além de coinfeções por esses vírus em outras três amostras de brássicas. Coinfeções por quatro vírus (CoMMV, BnRV1, TuMV e TuYV) foram confirmadas em uma planta de nabiça com sintomas de mosaico e amarelecimento foliar. Com as coletas e análises realizadas, foi possível identificar, além de isolados de carlavírus, a presença de outros dois vírus comuns em brássicas no Brasil, o TuMV e o CaMV, em infecções simples ou mistas, além de outros vírus que ainda não haviam sido relatados no Brasil, o CoMMV, um novo carlavírus, BnRV1 e o TuYV. Com isso, a diversidade de vírus associados aos cultivos de brássicas no Brasil parece ser muito maior do que até então se conhecia.

¹ A ocorrência desses vírus em território nacional foi oficialmente comunicada ao Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Vegetais da Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem, importância econômica e social das brássicas

As espécies de plantas pertencentes à família Brassicaceae (anteriormente denominada Cruciferae, pelo fato de suas flores possuírem formato de cruz), denominadas comumente de brássicas, tiveram sua provável origem em regiões do Mediterrâneo e Eurásia Ocidental (Hedge 1976; Gray 1982; Dixon 2006; Pakash et al. 2011). Há evidências de que o rabanete (*Raphanus sativus*) se originou a partir de ancestrais de nabiça (*R. raphanistrum*) no Mediterrâneo, sendo domesticada na Ásia antes da época Romana (Kaneko & Matsuzawa 1993). A hipótese de que as brássicas se originaram no Mediterrâneo é reforçada, uma vez que dados obtidos para variedades cultivadas de *Brassica oleracea*, por meio da integração de análises filogenéticas e genética de populações com dados arqueológicos, históricos e literários, indicam uma origem a partir da espécie selvagem *B. cretica*, endêmica do mar Egeu (Mabry et al. 2021).

A história da agricultura moderna pode ser contada por meio da domesticação e diversificação dos cultivos de brássicas, tornando-se parte da alimentação humana (Shyan et al. 2012), com destaque para a produção de olerícolas: agrião (*Nasturtium officinale*); brócolis (*B. oleracea* var. *italica*); couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *Pekinensis*); couve-de-folha (*B. oleracea* var. *acephala*); couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*); couve-de-Bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*); couve-tronchuda (*B. oleracea* var. *tronchuda*); couve-rábano (*B. oleracea* var. *gongylodes*); rabanete (*Raphanus sativus*); repolho (*B. oleracea* var. *capitata*); rúcula (*Eruca sativa*) (Filgueira 2008). As brássicas também são cultivadas para produção de óleos vegetais, como o óleo de canola (*Brassica napus*) (Newbert 2016), condimentos aromáticos (mostardas, *Brassica alba*, *B. juncea* e *B. nigra*) (Caballero et al. 2015), e para produção de peroxidase (raiz-forte, *A Armoracia rusticana*). Algumas espécies também são cultivadas como plantas ornamentais: repolho ornamental (*B. oleracea*); goivo (*Matthiola incana*); alisso (*Lobularia maritima*). Devido às características de suas raízes, o nabo-forrageiro (*Raphanus sativus*) é utilizado em sistemas de rotação de cultura para melhoria das condições físicas do solo. Muitas espécies de Brassicaceae estão presentes nos campos de produção, fazendo parte da vegetação espontânea, sendo muitas vezes consideradas plantas daninhas, podendo também atuar como reservatórios de vírus e de afídeos vetores: mostardas selvagens (*B. rapa*, *Rapistrum rugosum*, *Sinapis alba*, *S. arvensis*); agrião-bravo (*Cardamine bonariensis*); mastruço (*Coronopus didymus*); mentruz (*Lepidium* spp.); nabiça (*Raphanus raphanistrum*) (Rodrigues et al. 2019).

As brássicas são plantas de ciclo perene ou anual, com uma grande variabilidade morfológica, sendo a maioria de porte herbáceo (Camargo Filho & Camargo 2011). Brassicaceae é considerada uma das maiores famílias botânicas, com cerca de 400 gêneros e mais de 4.000 espécies. No Brasil, foram relatadas cerca de 50 espécies, distribuídas em 10 gêneros (Souza & Lorenzi 2008; Brighenti & Oliveira 2011). A evolução das brássicas cultivadas pode ser demonstrada por meio do “Triângulo de U” (Nagaharu 1935), que constitui a base da evolução das espécies desse gênero a partir de três ancestrais comuns diploides: *Brassica rapa* (n=10), *Brassica nigra* (n=8) e *Brassica oleracea* (n=9), que por hibridação interespecífica deram origem às espécies híbridas alotetraploides: *B. carinata* (n=17), *B. juncea* (n=18) e *B. napus* (n=19).

As brássicas são cultivadas mundialmente em todas as regiões agricultáveis, sendo que, no Brasil, o cultivo das brássicas teve início com a chegada dos portugueses (Madeira et al. 2008). De acordo com levantamentos realizados nas Centrais de Abastecimentos Estaduais (CEASA), distribuídas por todo o território nacional, o volume de comercialização de brássicas gira em torno de cerca de 200.000 toneladas, movimentando, anualmente, cerca de R\$ 240 milhões (Conab 2016). As regiões de cultivo de brássicas mais importantes do Brasil concentram-se nos cinturões verdes das grandes cidades, sendo os municípios ao redor de São Paulo e Curitiba os maiores produtores nacionais (Melo et al. 2019).

Somente no Estado de São Paulo, entre os anos de 2012 e 2016, foram comercializadas cerca de 85.000 toneladas, principalmente de espécies cultivadas dos gêneros *Brassica*, *Eruca* e *Raphanus*, gerando uma renda de cerca de R\$ 200 milhões (Agriannual 2013). Outro grande produtor nacional é o Distrito Federal que, em 2013, produziu cerca de 248 mil toneladas, gerando uma renda de R\$ 185 milhões (Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2017). As brássicas são altamente perecíveis e de comercialização rápida. A obtenção de dados mais precisos de comercialização no Brasil é afetada devido à comercialização informal por agricultores familiares, por meio da venda direta no próprio campo de produção ou para estabelecimentos comerciais próximos às áreas de cultivo (supermercados, mercearias, hortifrutigranjeiros), bem como em feiras livres. Somente uma parte da produção é destinada às centrais de abastecimento (Picolotto 2015; Nunes 2017).

2.2. Análises de viroma: revolucionando a virologia vegetal

As doenças causadas por vírus são uma ameaça constante para a humanidade, principalmente quando se tratam de vírus emergentes. Os vírus são onipresentes e capazes, pelo menos em

teoria, de colonizar qualquer célula viva, desde os procariontes mais simples aos eucariontes superiores, incluindo animais (invertebrados e vertebrados) e plantas nos mais diversos ambientes (Aylward & Moniruzzaman 2022; Cai et al. 2023). Capazes de estabelecer relações únicas vírus-hospedeiro e vírus-vetor (Ray & Casteel 2022), eles reprogramam rotas do metabolismo celular, alterando a composição das células hospedeiras, podendo, em circunstâncias especiais, levar à alteração de ecossistemas (Zimmerman et al., 2020) ou causar epidemias (Petersen et al. 2020; Jones 2021).

O vírus do mosaico do tabaco (tobacco mosaic virus, TMV, *Tobamovirus*) foi o primeiro vírus descoberto no mundo. Primeiro, o químico alemão Adolf E. Mayer, em 1886, reproduziu a doença do mosaico do tabaco por meio de inoculação mecânica do extrato de uma planta infectada para uma planta de tabaco sadia. Em 1892, o biólogo russo Dmitri Iwanowski, demonstrou que o extrato de folhas de tabaco infectadas era infeccioso mesmo após passar por filtros que retinham bactérias. Seis anos mais tarde, em 1898, o botânico holandês Martinus W. Beijerinck repetiu os experimentos de Iwanowski e denominou o possível agente infeccioso de *contagium vivum fluidum*, ou seja, um agente contagioso fluido (filtrável), distinto dos agentes corpusculares (bactérias, fungos e protozoários) conhecidos até então. Beijerinck também utiliza o termo “vírus” (em latim, veneno ou toxina) para descrever esse novo agente infeccioso. A descoberta de Beijerinck marca o nascimento da virologia como ciência [para uma revisão, ver Hull (2014)]. Nesse mesmo ano, em 1898, o primeiro vírus animal (filtrável) foi associado à febre aftosa pelos médicos alemães Friedrich Loeffler e Paul Frosch, e o primeiro vírus humano (filtrável), o agente da febre amarela, foi descrito, em 1901, pela equipe do médico estadunidense Walter Reed [para uma revisão, ver Fenner (2009)].

Com a descoberta desses patógenos não filtráveis (os vírus), as pesquisas científicas e clínicas foram focadas, nas primeiras décadas do século XX, na identificação desses agentes patogênicos, inicialmente por meio de testes biológicos e, posteriormente, utilizando técnicas sorológicas e químicas. As partículas dos vírus foram purificadas, e a composição química desses patógenos foi desvendada. Além disso, descobriu-se que as partículas virais se moviam em um campo elétrico, o que também ajudou a caracterizar a composição química (proteínas e ácidos nucleicos) e suas propriedades moleculares (Brown 2001; Enquist 2007). Com o advento do microscópio eletrônico de transmissão, foi possível observar pela primeira vez, em 1939, as partículas do TMV, possibilitando a compreensão de que os vírus eram constituídos por uma ou várias subunidades de proteínas (Brown 2001; Enquist 2007). Alguns

anos antes, em 1935, o bioquímico norteamericano Wendell M. Stanley já havia cristalizado as partículas do TMV, o que permitiu avanços no conhecimento da sua estrutura e composição química [ver para uma revisão Hull (2014)].

A evolução do conhecimento para desvendar as propriedades moleculares dos vírus abriu novas perspectivas com relação à capacidade desses agentes infecciosos de sofrerem mutações, e que seu material genético era constituído de RNA ou DNA. A partir desses conhecimentos, em 1960, foi possível realizar o primeiro sequenciamento de 158 aminoácidos do capsídeo do TMV. Em 1977, as primeiras técnicas para sequenciamento de DNA foram desenvolvidas, permitindo a obtenção de sequências de nucleotídeos de 80 a 1000 pares de bases (pb) (Sanger et al. 1977; Kapoor & Lipkin, 2014; Chaudhari et al. 2023). Em 1981, a técnica de hibridização *dot-blot* é empregada pela primeira vez para a detecção do potato spindle tuber viroid (PSTVd) (Owens & Diener 1981). Portanto, o período que antecede os anos 1980 foi importante para a descoberta de diferentes agentes infecciosos, incluindo os vírus. Nesse período, os principais métodos utilizados se baseavam em análises biológicas, microscopia eletrônica de transmissão, sorologia e nas abordagens iniciais envolvendo sequenciamento de DNA (Brown 2001; Kapoor & Lipkin 2014). A partir dessas abordagens iniciais e com o desenvolvimento do sequenciamento de DNA, outras técnicas e métodos de identificação e diagnóstico surgiram como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), desenvolvida pelo bioquímico estadunidense Kary Mullis e colaboradores no início dos anos 1980, além das técnicas baseadas em hibridização de ácidos nucleicos (*dot-*, *Northern-* e *Southern-blot*), microarranjos, entre outras. Em 1992, foi desenvolvida a PCR em tempo real (*real time* PCR, qPCR), que permitiu a quantificação de sequências-alvo, por meio da medição contínua, utilizando fluorescência durante a reação (Katsarou et al. 2019). Além disso, a qPCR tornou-se uma técnica muito utilizada devido à sua grande sensibilidade no diagnóstico de vírus, incluindo os vírus de plantas. Consequentemente, após o desenvolvimento das técnicas baseadas em PCR, diferentes abordagens para o sequenciamento de DNA (e também de RNA) começaram a surgir, sendo a principal delas o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*, NGS), também denominado sequenciamento de alto rendimento (*High-Throughput Sequencing*, HTS), que impulsionaram o sequenciamento de genomas completos (Brown 2001; Kapoor & Lipkin, 2014; Villamor et al. 2019; Chaudhari et al. 2023).

As diversas técnicas desenvolvidas e aprimoradas ao longo de décadas permitiram a descoberta, identificação e caracterização de novos vírus, sendo aperfeiçoada a classificação taxonômica com base em suas propriedades biológicas e moleculares. Acredita-se que os vírus sejam as entidades biológicas mais abundantes da Terra (Krupovic et al., 2019). Até o momento, existem 25 famílias de agentes virais (e subvirais), compreendendo vírus e viroides (pequenos RNA circulares) que infectam plantas, com dezenas de gêneros e mais de 1.500 espécies (<https://talk.ictvonline.org/taxonomia/>). No entanto, mesmo com os extraordinários avanços da genômica nas últimas décadas, ainda há um longo caminho a percorrer para desvendar a virosfera, que engloba toda a diversidade genética dos vírus, inclusive os que infectam plantas (Moubset et al., 2022).

Viroma é um termo que se refere ao conjunto de genomas de todos os vírus que são identificados, caracterizados e descritos por sequenciamento metagenômico de ácidos nucleicos virais, e que se encontram associados a um determinado organismo, hábitat ou ecossistema (Hasiów-Jaroszewska et al., 2021; Nakagawa et al., 2023; Roux & Emerson, 2022; Villamor et al., 2019).

As análises das bibliotecas de viroma geradas a partir de fragmentos e/ou sequências completas, pelo sequenciamento de HTS de amostras específicas ou ambientais, possibilita a descoberta de diferentes vírus de uma só vez (Kapoor & Lipkin, 2014). Com a evolução das técnicas de sequenciamento completo, novas ferramentas de análises de bioinformática foram desenvolvidas, inclusive programas *online*, facilitando e contribuindo para que as análises de viroma possam ser realizadas de maneira mais rápida e simples (Kutnjak et al. 2021; Hasiów-Jaroszewska et al. 2021). Estudos realizados a partir das análises de metagenômica viral têm permitido a descoberta de novas espécies virais em diferentes variedades de plantas comerciais e também em plantas da vegetação espontânea (Mabry et al. 2021). Além disso, as análises de metagenômica proporcionam a descoberta de novos vírus que, muitas vezes, não causam sintomas nas plantas infectadas. Essas descobertas viabilizam novos estudos e ampliam o conhecimento sobre as interações vírus-hospedeira e entre as coinfeções virais que ocorrem nas plantas infectadas e seus efeitos antagônicos ou sinérgicos, permitindo identificar os efeitos dessas interações que influenciam na dinâmica das infecções virais. Estudos de prevalência de espécies virais em campos de produção, diversidade de espécies que infectam variedades comerciais e da vegetação espontânea também podem ser realizados por meio das análises de viroma (Hasiów-Jaroszewska et al. 2021; Mabry et al. 2021; Lai et al. 2022).

Rivarez e colaboradores (2023) realizaram estudos aprofundados a partir de bibliotecas de viroma obtidas de plantas de tomate e de ervas daninhas coletadas em áreas agrícolas. Ao todo foram detectadas 125 espécies virais, sendo 79 consideradas como novas espécies virais e 65 delas encontradas apenas em ervas daninhas. Utilizando metagenômica, com o objetivo de verificar o censo da população viral em videiras doentes na África do Sul, detectou-se a presença de 4 patógenos virais conhecidos, sendo que a prevalência de 59% das leituras foi do grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), seguidas pelo grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) e grapevine virus A (GVA) (Coetzee et al. 2010). Além disso, a presença do grapevine virus E (GVE), que não havia sido descrito infectando videiras, também foi detectada, além de outras espécies de vírus (Coetzee et al. 2010). O sequenciamento de alto rendimento também pode ser utilizado em análises de comparação entre variedades de espécies de plantas introduzidas e naturais de uma determinada região. Lai e colaboradores (2022) realizaram análises de comparação de viromas entre variedades de plantas de batata introduzidas e “indígenas” utilizando HTS. Com as análises realizadas foi observada uma tendência de infecção entre cultivares nativos e introduzidos. Além disso, o potato virus S (PVS) e o potato virus Y (PVY) foram os mais frequentes nas plantas introduzidas, enquanto o potato virus M (PVM) apresentou porcentagem alta de infecção em plantas “indígenas”.

O desenvolvimento do HTS tem revolucionado diversas áreas da biologia. Com o avanço das tecnologias de metagenômica e o desenvolvimento de ferramentas que facilitam as análises, observa-se a possibilidade de redução dos custos tanto para a realização do sequenciamento quanto para as análises das bibliotecas, tornando-as cada vez mais acessíveis (Raza & Shahid 2020; Kutnjak et al. 2021). O avanço da genômica também tem auxiliado: (i) no entendimento sobre as interações vírus-hospedeiro e vírus-vetor; (ii) nos efeitos das coinfeções virais; (iii) no impacto das plantas da vegetação espontânea como reservatório de vírus; (iv) nas relações epidemiológicas; (v) nos possíveis efeitos que as mutações e recombinações virais podem causar no surgimento de novas doenças; e (vi) no desenvolvimento de técnicas mais eficientes de prevenção e controle de doenças virais nos campos de produção agrícola, evitando danos e perdas econômicas (Kapoor & Lipkin 2014; Raza & Shahid 2020; Kutnjak et al. 2021).

2.2.1. CoLV e CoMMV (*Carlavirus*): classificação, propriedades biológicas e moleculares

A família *Betaflexiviridae*, ordem *Tymovirales*, é dividida em duas subfamílias: *Quinvirinae* e *Trivirinae*. Os nomes propostos para as subfamílias foram definidos com base no número de genes conservados dos membros de cada subfamília: *Trivirinae* cujos membros possuem três ORF [replicase (1), proteína de movimento (1) e capa proteica (1)]; e *Quinvirinae* cujos membros possuem cinco ORF [replicase (1), triplo bloco gênico (3) e capa proteica (1)]. Os critérios de demarcação das espécies de *Betaflexiviridae* foram definidos com base nas sequências de nucleotídeos e/ou aminoácidos que codificam a replicase e a capa proteica (CP) (ICTV 2022). Vírus de diferentes gêneros devem possuir menos de 45% de identidade de nucleotídeos nessas ORFs. Para a determinação das espécies, a identidade de nucleotídeos das regiões genômicas da replicase e/ou capa proteica deve ser menor que 72% e para os aminoácidos, menor que 80%. Das espécies de vírus pertencentes à família *Betaflexiviridae*, quase 50% (67 espécies) pertencem ao gênero *Carlavirus*, sendo *Carnation latent virus* a espécie que deu origem ao nome do gênero (ICTV 2022).

Os vírus do gênero *Carlavirus* possuem partículas flexuosas alongadas com 610 a 700 nm de comprimento e 12 a 15 nm de diâmetro (Figura 1 A e B). O genoma é constituído por um RNA linear de fita simples e senso positivo [(+)ssRNA], entre 7,4 e 8,9 kb, que possui seis ORF, cauda de poliadenilação [poly(A)] no terminal 3' e, em algumas espécies, estrutura cap no terminal 5' (Figura 1C). A **ORF 1** codifica uma proteína com função de replicase, que apresenta quatro domínios conservados: metiltransferase (Mt), protease do tipo papaína (P-Pro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). As **ORFs 2, 3 e 4** formam o triplo bloco gênico (TGB), que codificam proteínas relacionadas com o movimento do vírus célula a célula. A **ORF 5** codifica a CP, e a **ORF 6** codifica uma proteína rica em cisteína com capacidade de ligação a ácidos nucleicos (RBP), com atividade associada à supressão de silenciamento gênico (Figura 1D). As ORFs mais próximas ao terminal 3' são traduzidas por dois RNAs subgenômicos (Adams et al. 2004; Gaspar et al. 2008; Igori et al. 2016; Zanardo & Carvalho 2017).

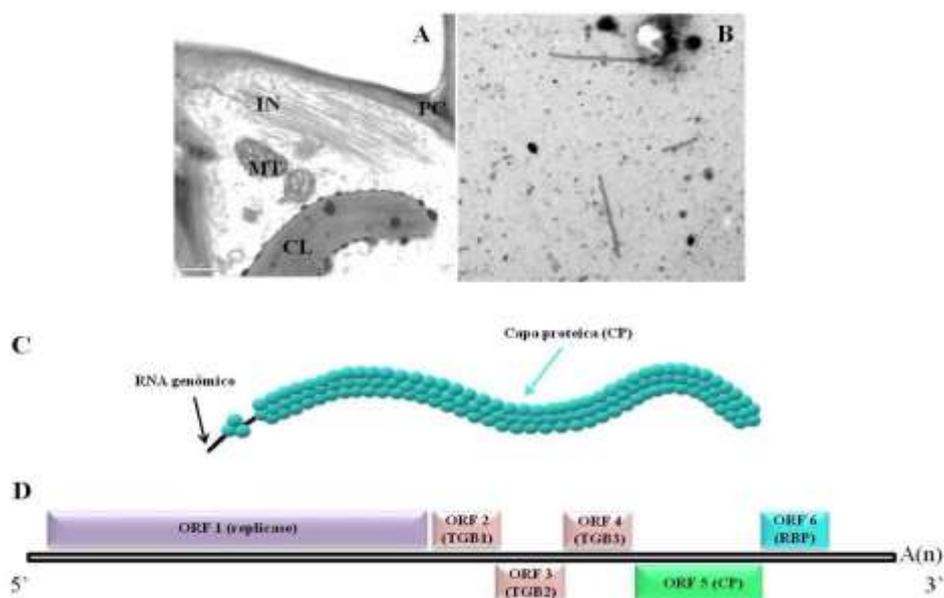


Figura 1: (A) Corte ultrafino de folha de couve, proveniente de Pirenópolis (GO), apresentando inclusões citoplasmáticas típicas daquelas induzidas por carlavírus; (B) *Leaf-dip* da amostra de couve de Pirenópolis em que se observam partículas típicas de carlavírus; (C) Partícula flexuosa alongada com 610-700 nm de comprimento e 12-15 nm de diâmetro, com a representação das subunidades da proteína da capa (CP), em azul, envolvendo a fita simples de RNA; (D) Esquema da organização genômica dos carlavírus, indicando a posição de cada ORF. (Imagens: Dr. E.W. Kitajima, NAP-MEPA, ESALQ, USP). Parede celular (PC), mitocôndria (MT), cloroplasto (CL), inclusão citoplasmática (In). (Fonte: O Autor).

Das 67 espécies de carlavírus oficialmente aceitas pelo ICTV, sete foram relatadas no Brasil e em diferentes espécies de plantas cultivadas: garlic common latent virus (GarCLV) e shallot latent virus (SLV) em alho (*Allium sativum* L.); melon yellowing associated virus (MYaV) em meloeiro (*Cucumis melo* L.); cowpea mild mottle virus (CPMMV) em soja [*Glycine max* (L.) Merr.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.); potato virus M (PVM) em batateira (*Solanum tuberosum* L.); sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV) em batata-doce [*Ipomea batatas* (L.) Lam.]; e o cole latent virus (CoLV) em raiz-forte, couve-flor, brócolis, couve, nabo e couve-chinesa (Kitajima et al. 1970; Daniels et al. 1978; Lin et al. 1979; Dusi et al. 1994; Eiras et al. 2008; Lima et al. 2009). Um possível carlavírus identificado em fedegoso (*Cassia macranthera* DC) e ponçada (*Cassia sylvestris* Wilkstrom) nos Estados do PR e SP, foi denominado Cassia mild mosaic virus (CasMMoV) (Seabra et al. 2001). Em 2016, porém, uma porção do genoma (replicase) do CasMMoV foi sequenciada (código de acesso no GenBank: GU481094), e tudo indica que esse vírus deve pertencer ao gênero *Allexivirus* (família *Alphaflexiviridae*, ordem *Tymovirales*). Porém, até o momento essa proposta não foi aceita pelo ICTV. Outros possíveis carlavírus também foram identificados em cebolinha (*Allium ascalonicum* Baker), alstroeméria (*Alstroemeria* sp.) e em seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) (Gama et al. 1983; Colariccio et al.

1996). Por meio de sequenciamento de nova geração e análises filogenéticas, uma nova espécie de *Betaflexiviridae* foi descoberta em alho (*Allium sativum* L.), no Brasil (Da Silva et al. 2019).

O primeiro relato de CoLV ocorreu no Estado de São Paulo em couve (Kitajima et al. 1970). Ao realizarem investigações com relação à suscetibilidade de variedades de couve ao TuMV, observou-se a presença de um vírus “latente” (as plantas não expressavam qualquer sintoma), denominado então de “vírus latente da couve”. Além do seu caráter latente por não induzir sintomas em couve, ser transmitido mecanicamente e por afídeos, os resultados obtidos por meio de ‘leaf-dip’ e preparações de cortes ultrafinos permitiu que se observassem ao microscópio eletrônico de transmissão partículas alongadas flexuosas com cerca de 650 nm e inclusões citoplasmáticas típicas daquelas induzidas por outros carlavírus. Naquela ocasião, o vírus foi classificado como pertencente ao grupo do “vírus S da batata” (potato virus S, PVS). Em seguida, porém, esse vírus foi identificado como sendo uma nova espécie de carlavírus e denominado *Cole latent virus* (Belintani et al. 2002). Posteriormente, isolados de CoLV foram identificados em raiz-forte, em amostras coletadas na cidade de Divinolândia, SP. As plantas exibiam mosaico e anéis cloróticos, o que pode indicar que em alguns casos o vírus pode se comportar de forma não latente. Porém, muitas plantas estavam coinfectadas com o TuMV, o que não possibilitou que se concluísse sobre o efeito isolado do CoLV em plantas de raiz-forte (Eiras et al. 2008).

O CoLV possui características típicas dos vírus pertencentes ao gênero *Carlavirus*. A estratégia de expressão de suas proteínas próximas ao terminal 3’ (CP de 38 kDa e proteína de 11 kDa) é baseada na síntese de RNAs subgenômicos de 1,3 e 2,6 kb (Belintani et al. 2002; Belintani & Gaspar 2003; Adams et al. 2004). Além disso, a gama de hospedeiros experimentais do CoLV parece estar restrita a pouquíssimas espécies, tais como: *B. oleracea* var. *acephala*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Citrullus lanatus*, *Glycine max*, *Gomphrena globosa*, *Malva parviflora*, *Phaseolus vulgaris*, *Raphanus sativus*, e *Solanum melongena* (Mello et al. 1987; Brunt et al. 1997). Nas hospedeiras naturais, as infecções pelo CoLV transcorrem de forma assintomáticas (latência) ou induzindo clareamento de nervuras e um mosaico brando nas folhas. Há pouco conhecimento sobre o comportamento e epidemiologia dos carlavírus nos cultivos de brássicas (Mello et al. 1987) e, até o presente momento, não se conhece a variabilidade genética das populações desses vírus.

2.2.2. CaMV (*Caulimovirus*): Classificação, propriedades biológicas e moleculares

A família *Caulimoviridae* possui 11 gêneros e 99 espécies descritas e aceitas pelo ICTV (ICTV 2023). O cauliflower mosaic virus (CaMV), gênero *Caulimovirus*, possui partículas isométricas de 50 nm de diâmetro e seu genoma é constituído por um DNA circular de fita dupla, com descontinuidades, com tamanho de 8kb e 7 ORFs (Figura 2A) (Haas et al. 2002; Scholthof et al. 2011; Teycheney et al. 2020; ICTV 2023; Viralzone 2023). A ORF1 (P1-MP) está relacionada ao movimento célula a célula das partículas virais. As ORF 2 / P2 (fator de transmissão associado ao afídeo vetor – ATF) e ORF 3 / P3 (proteína associada ao vírus - VAP) estão relacionadas a transmissão do vírus por insetos vetores (afídeos), sendo que a P2 se liga ao receptor do afídeo, enquanto a P3 se associa à partícula viral. A ORF 4 codifica a capa proteica (CP). A ORF 5 / P5 (poliproteína - POL) é uma poliproteína iniciadora da proteína viral, ribonuclease (RNase) H e da transcriptase reversa, com atividade essencial na replicação viral. A ORF 6/ P6 (transativação da proteína de viroplasma - TAV) agrega-se aos corpos de inclusão e dentro dessas estruturas inicia a tradução transativadora das ORF 1 a 5 (Figura 2B) (Haas et al. 2002; Scholthof et al. 2011; Teycheney et al. 2020). A ORF 7 ainda não tem função definida. As proteínas de 1 a 5 são expressas a partir de um RNA 35S policistrônico, e a sexta proteína é traduzida pelo RNA 16S monocistrônico (Haas et al. 2002; Scholthof et al. 2011; Teycheney et al. 2020).

A estratégia de replicação do CaMV é baseada na síntese de DNA viral a partir da retrotranscrição de um RNA pré-genômico. A replicação tem início com a ligação das proteínas virais aos receptores do hospedeiro que mediam a entrada na célula hospedeira. Em seguida, o dsDNA viral é liberado e transcrito no núcleo pela RNA polimerase II do hospedeiro. A partir da tradução do mRNA é produzida as proteínas virais e, no citoplasma, o RNA genômico é retrotranscrito em novos genomas de dsDNA (Hass et al. 2002; Bak & Emerson, 2020; Viralzone 2023; ICTV 2023). Os genomas são encapsidados pela proteína do capsídeo e novos virions são formados. Devido à característica de integrar seu genoma ao genoma do hospedeiro os caulimovirus estão inseridos no supergrupo denominado pararetrovirus.

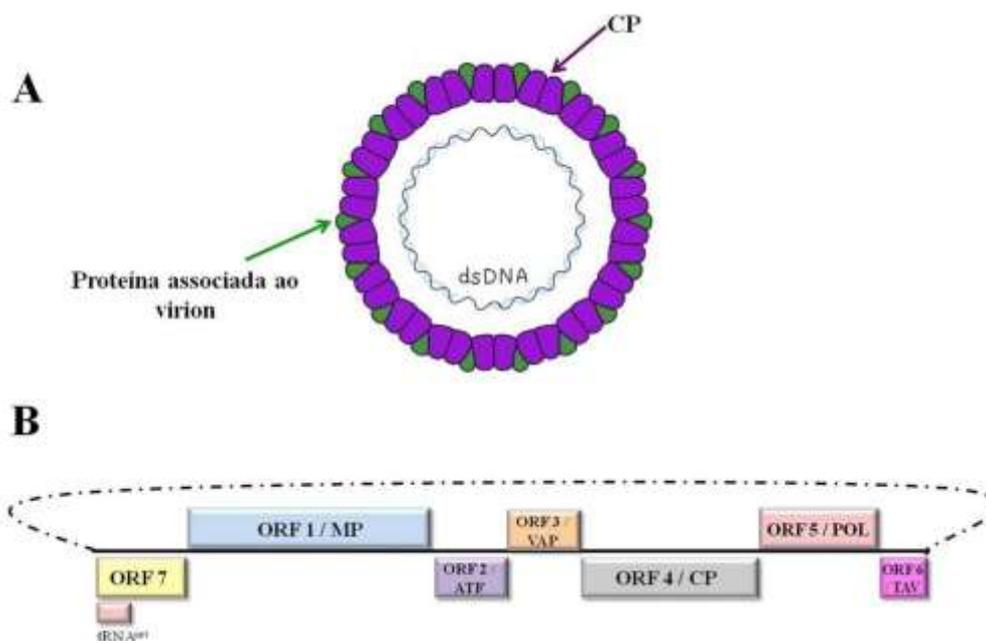


Figura 2: (A) Esquema da partícula isométrica de um caulimovírus. (B) Representação esquemática do DNA circular de fita dupla e a organização genômica dos caulimovírus. ORF 1/MP – movimento célula a célula; ORF 2/ATF e 3/VAP interação vírus-vetor, P2 liga-se ao receptor do afídeo e a P3 esta associada a partícula viral. ORF 4/CP – codifica a capa proteica; ORF 5/POL – replicação viral; ORF 6/TAV - tradução transativadora das ORF 1 a 5. (Fonte: O Autor).

Os critérios de demarcação de gêneros da família *Caulimoviridae* são definidos com base na morfologia dos vírus (baciliformes ou isométricos), organização genômica (número de ORFs), modo de transmissão e espécie de inseto vetor e tipos de plantas hospedeiras (monocotiledôneas, dicotiledôneas ou ambos) (Teycheney et al. 2020; ICTV 2023). Os critérios de demarcação de espécies do gênero *Caulimovirus* são feito com base nas hospedeiras e na diferença de mais de 20% na sequência de nucleotídeos da polimerase (RT + RNase H) (Teycheney et al. 2020; ICTV 2023).

O CaMV está disseminado mundialmente, ocorrendo com frequência em campos de produção de brássicas na Europa, Ásia, Estados Unidos, Reino Unido, Nova Zelândia e União Européia. A gama de hospedeiros naturais parece estar restrita a plantas da família Brassicaceae (Spence et al. 2007; Bak & Emerson, 2020). No Brasil, a primeira evidência da ocorrência do CaMV foi no ano de 1963, baseado apenas em sintomas encontrados em brássicas. Em 1965, foi feito o primeiro relato do CaMV induzindo clareamento de nervuras em folhas de couve (*Brassica oleracea*). No estado do Rio Grande do Sul (RS) foi relatado ocorrendo em goivo (*Mantthiola incana*) e em petunia (*Petunia hybrida*) coinfectada com petunia vein banding virus (PetVB). Também foi detectado em coinfeções com turnip mosaic virus (TuMV) e cucumber mosaic virus (CMV) em canola (*B. napus*) e causando

sintomas de mosaico em mostarda (*B. rapa*) no Paraná (PR). Foi relato também ocorrendo em brássicas no Espírito Santo (ES) e em couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) no estado de São Paulo (SP). Além disso, o CaMV já foi descrito ocorrendo em diferentes variedades de brássicas como couve-de-folha (*B. oleracea* var. *acephala*), agrião (*Nasturtium officinale*), rúcula (*Eruca sativa*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), couve-rábano (*B. oleracea* var. *gongylodes*) e brócolis (*B. oleracea* var. *italica*). O CaMV é encontrado frequentemente em plantas da vegetação espontânea como mostarda-selvagem (*Sinapis alba*) e nabiça (*Raphanus raphanistrum*) (Kitajima 2020).

Os sintomas induzidos pelo CaMV podem variar de mosaico, clareamento de nervuras, clorose, deformação e manchas foliares até a redução do porte da planta. No entanto, a variedade e intensidade dos sintomas pode variar de acordo com as condições ambientais, genética da planta hospedeira e a estirpe viral do CaMV (Bak & Emerson, 2020).

2.2.3. TuMV (*Potyvirus*): Classificação, propriedades biológicas e moleculares

Os vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, possuem partículas flexuosas alongadas com cerca de 750 nm de comprimento. Seu genoma é constituído por um (+)ssRNA, com cerca de 10 kb, sendo a extremidade 5' ligada a uma proteína viral (VPg) e cauda de poliadenilação [poly(A)] no terminal 3 (Figura 3A) (ICTV 2023; ViralZone 2023). O genoma dos potyvirus possuem uma única ORF que codifica uma poliproteína que, após sua tradução, da origem as proteínas P1, HC-Pro (componente auxiliar da protease), P3, 6K1, CI (inclusão citoplasmática), 6K2, VPg, CP (capa proteica), NIa e NIb (proteína nuclear a e b). A proteína P3N-PIPO é originada após a tradução de um ORF sobreposta à região genômica correspondente à proteína P3, e atua no movimento célula a célula (Figura 3B) (Walsh et al., 2002; Adams et al., 2012; Xue et al. 2023). A estratégia de replicação é realizada com base no RNA genômico que se replica através de um RNA completo de senso negativo que ocorre no complexo de replicação viral citoplasmática (VRC) que é formado pelas proteínas virais NIb, NIa-Pro, HC-Pro, 6K2, VPg, CI, P3 e 6K1, além de incluir fatores relacionados as células hospedeiras. Após a replicação o genoma é transportado célula a célula através dos plasmodesmas pela ação das proteínas P3, 6K2, P3-PIPO, CI e CP (Inoue-Nagata et al. 2022). O TuMV produz efeitos citopáticos no citoplasma das células hospedeiras, podendo dar origem a formas características conhecidas como cataventos, que são formados a partir de suas partículas virais (López-Moya & Garcia 2008).

A família *Potyviridae* abriga 12 gêneros, 244 espécies, sendo que dessas, 201 espécies pertencem ao gênero *Potyvirus* (ICTV 2023). Os critérios de demarcação dos gêneros da família *Potyviridae* são realizados com base na gama de hospedeiros, características do genoma, inseto vetor e filogenia. A demarcação de espécies é feita a partir de análises de porcentagem de identidade de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) da maior ORF do genoma (ou, caso necessário, pode ser utilizada a porção genômica codificadora da CP) deve ser menor que 76% de indentidade de nt, menor que 82% de identidade de aa. Outras regiões codificadoras podem ser utilizadas para a demarcação de espécies novas, porém o limite para a porção genômica codificadora da P1 é de 58% e de 74-78% para outras regiões (Inoue-Nagata et al. 2022; ICTV 2023).

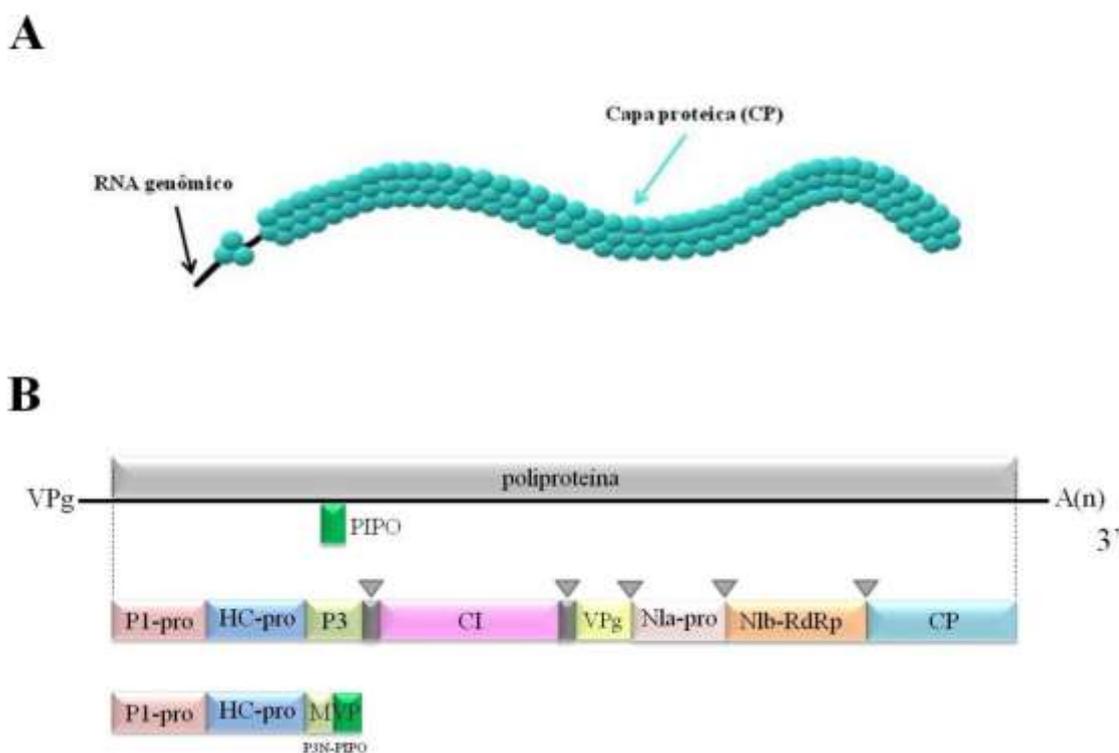


Figura 3: (A) Esquema da partícula flexuosa alongada com cerca de 750 nm de comprimento. (B) Representação esquemática do RNA de fita simples e a organização genômica dos potyvirus. ORF única que codifica uma poliproteína que da origem as proteínas P1 (proteína 1), HC-Pro (componente auxiliar da protease), P3 (proteína 3), 6K1 (peptídeo 1 de 6 kDa), CI (inclusão citoplasmática), 6K2 (peptídeo 2 de 6 kDa), VPg (proteína do vírus ligada ao genoma), CP (capa proteica), NIa e NIb (proteína nuclear a e b); P3N-PIPO atua no movimento célula a célula (Fonte: O Autor).

O TuMV já foi relatado ocorrendo em diferentes países do continente Europeu, da Ásia, África, Américas e Oceania. Além disso, é considerado o segundo vírus no mundo que mais causa danos e, conseqüentemente, perdas econômicas em diversos cultivos, incluindo

brássicas (Li et al. 2019). No Brasil, em 1974, foi descrita a ocorrência do TuMV em rabanete (*Raphanus sativus*) com sintomas de mosaico no Estado de São Paulo, além de ser identificado infectando agrião (*Nasturtium officinale*), e em coinfeção com o CoLV com sintomas de mosaico em folhas de raiz-forte (*A Armoracia rusticana*). Também foi relatado causando sintomas de clareamento de nervuras, pontos e anéis cloróticos em capuchinha (*Tropaeolum majus*). Em amostras de mostarda (*Sinapis alba*) provenientes dos estados do Rio de Janeiro e Paraná, com sintomas de mosaico foi identificada a presença de um isolado de TuMV. Além disso, foi descrito ocorrendo em Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES) e Distrito Federal (DF) (Kitajima 2020). O TuMV pode induzir diferentes tipos de sintomas em suas hospedeiras como mosaico, redução do tamanho e volume da planta infectada, clareamento de nervuras, deformações, necrose e anéis cloróticos ou necróticos (Tomlinson 1970; Li et al. 2019).

2.2.4. TuYV (*Polerovirus*): Classificação, propriedades biológicas e moleculares

Os vírus pertencentes ao gênero *Polerovirus*, família *Solemoviridae*, possuem partículas isométricas (com estrutura icosaédrica T=3), com cerca de 25 nm de diâmetro (Figura 3A). O genoma desses vírus é constituído por um único (+)ssRNA não segmentado, com 4 a 6 kb, com uma proteína viral (VPg) ligada ao terminal 5' (Miller 1999; Ali et al. 2018; Delfosse et al. 2021; ICTV 2022). A replicação ocorre no citoplasma das células infectadas, e tem início após a tradução da polimerase viral, uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Uma estrutura conservada (ACAA) da extremidade 5' e uma estrutura secundária do tipo RNA transportador (tRNA) no terminal 3' são consideradas essenciais no processo de replicação dos polerovírus (Miller et al. 1997; Miller 1999). Sabe-se que a ancoragem na membrana celular é essencial, porém ainda se desconhecem os compartimentos celulares onde ocorre o processo de replicação viral (Miller 1999; Delfosse et al. 2021).

Os critérios de demarcação estabelecidos para designação dos gêneros da família *Solemoviridae* foram definidos com base na filogenia individual de cada ORF ou de cada proteína e comparações estruturais de cada proteína codificada ou dos virions (ICTV 2022).

O genoma dos polerovírus possui nove ORFs, que codificam as proteínas virais (Figura 4). As ORFs 0, 1 e 2 são traduzidas a partir do RNA genômico. A ORF1 (P1) e a ORF2 (P2) são traduzidas, por meio de um mecanismo de recodificação traducional para produzir uma proteína fusionada (polimerase viral – RdRp). As ORFs (P3a, P3, P4 e P5) próximas ao terminal 3' são traduzidas pelo RNA subgenômico 1, enquanto as ORFs 6 e 7 (P6 e P7) são

traduzidas pelo RNA subgenômico 2. A ORF 7 também é traduzida a partir de um terceiro RNA subgenômico. A ORF 5 (P5) é expressa como uma proteína de fusão por meio de uma leitura através do códon de parada fraco (UAA) da ORF 3 (Miller 1999; Delfosse et al. 2021). Estudos identificaram que cada proteína pode assumir mais de uma função (Delfosse et al. 2021). A proteína P0 atua como supressora de silenciamento gênico, está associada à indução de sintomas e patogenicidade, é um fator de avirulência envolvida na quebra de resistência, além de modular interações planta-vetor por meio da regulação dos fitohormônios. A proteína P1 atua no complexo de replicação viral, na proteólise e na ligação da VPg ao RNA viral e, assim como a P0, é mediadora de mudanças nas interações planta-vetor. A proteína P3a possui a função de proteína de movimento, enquanto P3 atua no movimento, estabilidade e transmissão do vírus, além de interagir com as proteínas da planta hospedeira. A proteína P4 também está envolvida no movimento célula a célula através dos plasmodesmas e no movimento sistêmico (via floema). As proteínas P3 e P5 estão relacionadas às interações vírus-vetor, na indução de sintomas e no movimento do vírus via floema. A proteína P7 exerce um papel na regulação da ligação do genoma de RNA, além de mediar as mudanças nas interações planta-vetor. A funções da proteína P6 ainda são desconhecidas (Figura 4B)(Miller 1999; Ali et al. 2018; Delfosse et al. 2021, ViralZone 2022; ICTV 2022).

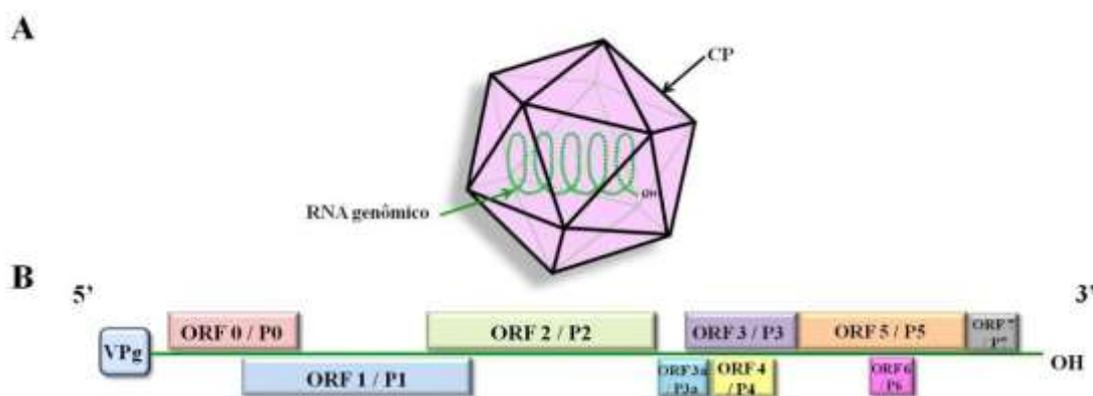


Figura 4: (A) Esquema da partícula isométrica de um polerovírus. (B) Representação esquemática do RNA de fita simples e a organização genômica dos polerovírus P0 - atua como uma proteína supressora de silenciamento gênico; P1 - replicação viral, proteólise e ligação da VPg ao genoma viral; P1 e P2-- replicase (RNA polimerase dependente de RNA – RdRp). P3a - proteína de movimento; P3 - capa proteica; P4 - movimento célula a célula e via floema; P3 e P5 - interação vírus-vetor, desenvolvimento de sintomas e movimento via floema; P7 -

regulação da ligação do genoma de RNA e interações planta-vetor. P6 – proteína com função desconhecida. (Fonte: O Autor).

Os polerovírus são considerados patógenos que afetam culturas de grande interesse econômico, tais como solanáceas, cucurbitáceas, gramíneas e brássicas. A gama de hospedeiros naturais dos vírus que pertencem a cada gênero da família *Solemoviridae*, incluindo membros do gênero *Polerovirus*, parece ser restrita. Os sintomas mais comuns causados por esses vírus são nanismo, amarelecimento e vermelhidão nas folhas, deformação foliar e aumento da fragilidade das folhas (Miller 1999). Alguns dos sintomas causados podem ser facilmente confundidos com deficiência nutricional (Hull 2014).

Na década de 1760, no Reino Unido, foi observada uma doença que afetou o cultivo de batatas por um período de mais de 10 anos. Hoje, acredita-se que o patógeno era o potato leafroll virus (PLRV, *Polerovirus*), que só foi descrito em 1916 (Talianky et al. 2003). No Brasil, em 1938, foi relatada pela primeira vez uma doença em algodoeiro denominada mosaico das nervuras (conhecida como ‘doença azul’), que posteriormente foi caracterizada como uma virose causada pelo cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) (Miranda et al. 2008). A partir de 1949, o CLRDV foi identificado em outros países (Miranda et al. 2008). Estes parecem ser os primeiros relatos de polerovírus.

O gênero *Polerovirus* abriga 26 espécies definitivas (ICTV 2022). No Brasil, a ocorrência dos seguintes polerovírus já foi relatada: potato leafroll virus (PLRV) em *Ambrosia elaiator*, *Bidens pilosa*, *Conyza canadensis*, *Galinsoga parviflora* e *Vernonia polyantes* (Asteraceae) e *Solanum viarum* (Solanaceae) no estado de Minas Gerais, *Solanum variable* (entre outras solanáceas) em São Paulo, tomateiro (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae) nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Distrito Federal; cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) em meloeiro (*Cucumis melo*, Cucurbitaceae) no Ceará e em maracujazeiro (*Passiflora* spp., Passifloraceae) no estado da Bahia; carrot red leaf virus (CaRLV) em cenoura (*Daucus carota*, Apiaceae) nos estados de São Paulo e Minas Gerais; cotton anthocyanosis virus (CotAV) nos estados de São Paulo e Bahia, cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) no Distrito Federal, São Paulo, Goiás e Paraná; e cotton vein mosaic virus (CotVMV) em Mato Grosso e São Paulo, todos ocorrendo algodão (*Gossypium hirsutum*, Malvaceae); sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) em São Paulo em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, Poaceae) e maize yellow mosaic virus (MaYMV) em milho (*Zea mays*, Poaceae) no estado de São Paulo (Kitajima 2020).

O TuYV já foi relatado em diversos países da Europa, América do Norte, Ásia, Oceania e Oriente Médio. A gama de hospedeiras do TuYV envolve espécies de plantas cultivadas e da vegetação espontânea pertencentes à família Brassicaceae. Algumas espécies de plantas das famílias Asteraceae, Amaranthaceae e Fabaceae também podem ser suscetíveis (Newbert 2016).

2.2.5. BnRV1 (*Waikavirus*): Classificação, propriedades biológicas e moleculares

Os vírus do gênero *Waikavirus* possuem partículas isométricas (com estrutura icosaédrica pseudo T=3) não envelopadas com aproximadamente 25-30 nm de diâmetro. O genoma desses vírus é constituído por um (+)ssRNA linear com 12 kb, uma cauda de poli-A no terminal 3' e uma proteína viral (VPg) ligada covalentemente no terminal 5'. A estratégia de expressão é baseada em uma poliproteína, que sofre clivagem (processamento pós-traducional), originando as oito proteínas virais funcionais (Figura 5) (Sanfaçon et al. 2009; ViralZone 2022; ICTV 2023). O RNA viral é infeccioso e atua diretamente como RNA mensageiro (mRNA). A poliproteína gerada sofrerá as clivagens proteolíticas fornecendo as proteínas virais funcionais. Subsequentemente, a replicação do vírus ocorre em vesículas das membranas derivadas do RE (retículo endoplasmático), nas chamadas “fábricas” virais. Na sequência, RNAs de fita dupla (dsRNA) são sintetizados a partir das moléculas de ssRNA genômico de senso positivo, fornecendo novos genomas de (+)ssRNA. E por fim é realizada a montagem de novas partículas virais (Sanfaçon et al. 2009; Park & Hahn 2019; ViralZone 2023).

O brassica napus RNA virus 1 (BnRV1) foi classificado como pertencente à espécie *Waikavirus brassicae* pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), e em função de sua estrutura genômica e propriedades moleculares, foi classificado como pertencente ao gênero *Waikavirus*, família *Secoviridae* (Park & Hahn 2019, ICTV 2023). Membros da família *Secoviridae* possuem características em comum: (i) capacidade de infectar plantas utilizando proteínas ou domínios específicos (proteína de movimento e/ou capsídeo adaptado para esta função); (ii) partículas isométricas (com capsídeo pseudo T=3); (iii) ssRNA de senso positivo, com estratégia de expressão baseada em poliproteína; (iv) e blocos de replicação constituídos por helicase, 3C-like proteinase e polimerase. Além disso, em análises filogenéticas com base na sequência de aminoácidos (aa) da porção genômica da Pro-Pol (3C-like proteinase + RNA polimerase dependente de RNA), os vírus dessa família agrupam-se em um único clado (Sanfaçon et al.

2009; Thompson et al. 2017). Os critérios de demarcação estabelecidos para designação dos membros da família *Secoviridae* em gêneros foi definida com base: (i) no número de RNAs presentes no genoma viral; (ii) no número de proteínas e/ou locais de processamento; (iii) no número de capas proteicas (CPs); (iv) na presença de RNAs subgenômicos ou fases de leitura abertas (ORF); (v) e nas propriedades das proteínas ou dos domínios das proteínas envolvidos no movimento célula a célula (Azzam & Chancellor 2002; Sanfaçon et al. 2009; Stewart 2011; Thompson et al. 2017; ICTV 2022). Os critérios para demarcação de espécies no gênero *Waikavirus* são baseados: (i) na porcentagem de identidade da sequência de aminoácidos (aa) da CP, que deve ser menor que 75% (para vírus com duas ou três CPs), e da região conservada da Pro-Pol, com valores de porcentagem de identidade de aa menores que 80%; (ii) em diferenças nas regiões antigênicas; (iii) nos vetores e hospedeiras; (iv) na ausência de proteção cruzada; e (v) para vírus com genoma bipartido, ausência de rearranjos (*reassortment*) entre o RNA 1 e RNA 2 (Sanfaçon et al. 2009; ICTV 2022).

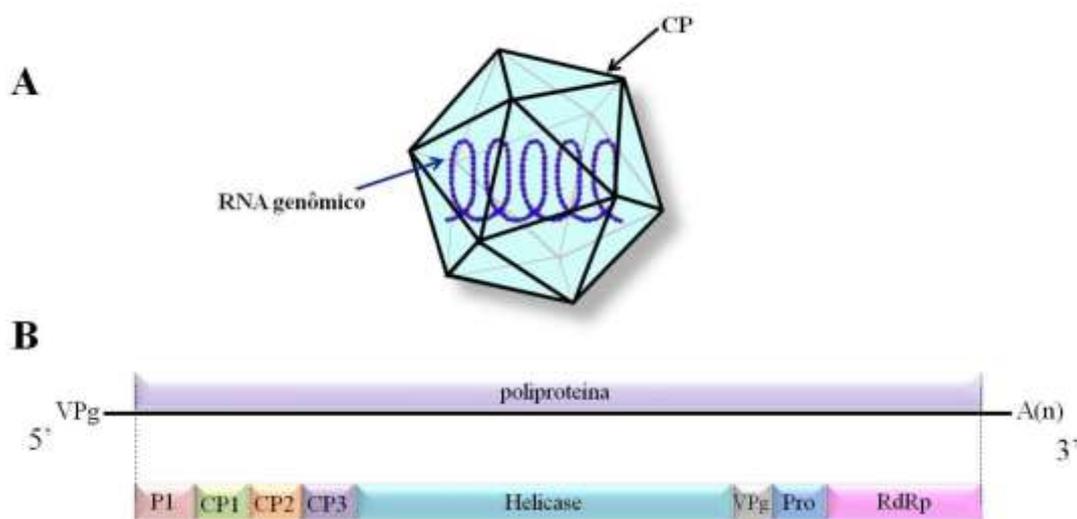


Figura 5: (A) Esquema de uma partícula isométrica de um waikavírus. (B) Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Waikavirus*. O RNA viral possui uma cauda poliadenilada ($A_{(n)}$) no terminal 3', uma proteína viral (VPg) ligada covalentemente ao terminal 5', e uma única ORF, que codifica uma poliproteína que, após ser clivada (processamento pós-traducional), origina as oito proteínas virais: proteína hipotética (P1); três proteínas da cápside (CP1, CP2, CP3), Helicase (Hel), VPg, 3C-like proteinase (Pro) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). (Fonte: O autor).

Os vírus pertencentes ao gênero *Waikavirus* foram relatados ocorrendo em países asiáticos, Sul dos Estados Unidos e México (Hibino 1996; Azzam & Chancellor 2002; ViralZone 2022). Em meados de 1800, no Sul e Sudeste da Ásia, um surto de uma doença denominada 'tungro' (crescimento degenerado) ocorreu em áreas de cultivo de arroz (*Oryza*

sativa). A partir daquele momento, ‘tungro’ passou a ser considerada uma doença de grande importância econômica e de difícil controle, devido ao impacto causado nas áreas de cultivo de arroz (Shinkai 1977; Hibino 1996; Azzam & Chancellor 2002). Acredita-se que essa pode ser considerada a primeira descrição da ocorrência de um waikavírus. No início dos anos 1960, atribuiu-se uma etiologia viral a essa doença, com transmissão associada a cigarrinhas vetoras. O vírus foi, posteriormente, denominado rice tungro spherical virus (RTSV), atualmente, pertencente à espécie *Waikavirus orizae* (Hibino 1996; Azzam & Chancellor 2002, Stewart 2011). Na mesma década, nos Estados Unidos, surgiu uma doença que causava redução do crescimento (nanismo) do milho (*Zea mays*). Nos anos 1970, após ampla disseminação da doença, foi identificado um vírus esférico associado ao nanismo do milho denominado maize chlorotic dwarf virus (MCDV) (Hunt & Nault 1990, Stewart 2011), atualmente pertencente à espécie *Waikavirus zaeae*. O RTSV e o MCDV são considerados os vírus mais importantes do gênero, devido aos danos que causam com consequentes perdas econômicas (Azzam & Chancellor 2002; Stewart 2011, Seo et al. 2015). Os outros vírus classificados no gênero *Waikavirus* são: anthriscus yellows virus (AYV, *Waikavirus anthrisci*), que foi descrito infectando plantas de cicuta (*Anthriscus sylvestris*) e parsnip yellow fleck virus (PYFV, *Sequivirus pastinacae*) infectando plantas de pastinaca (*Pastinaca sativa*), respectivamente (Murant & Goold 1968; Murant & Roberts 1977).

Em 2015, mais um waikavirus foi identificado, na Coreia do Sul, em plantas de campânula (*Campanula takesimana*) com sintomas de clorose das nervuras das folhas e nanismo, sendo denominado bellflower vein chlorosis virus (BVCoV) (Seo et al. 2015), pertencente à espécie *Waikavirus campanulae*. Além disso, três novas espécies tentativas do gênero *Waikavirus* foram descritas recentemente: *Waikavirus ribesnigri* (black currant waikavirus A, BCWVA) em groselha-preta (*Ribes nigrum*) na Coreia do Sul; camellia virus A (CamVA) em plantas de camélia (*Camellia japonica*) na China; e o BnRV1 descrito infectando canola (*Brassica napus*) na Coreia do Sul (Park & Hahn 2019; Thekke-veetil et al. 2020; Liao et al. 2021). A gama de hospedeiras dos waikavírus parece estar restrita apenas a algumas espécies das famílias Apiaceae, Campanulaceae, Cyperaceae, Poaceae, Theaceae e, mais recentemente, com a descoberta do BnRV1, Brassicaceae. Dos quatro vírus (RTSV, MCDV, AYV e PYFV), classificados como espécies definitivas do gênero *Waikavirus*, apenas o MCDV foi relatado no Brasil em *Brachiaria* sp. e *Panicum* sp., em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Kitajima 2020). Além disso, outros vírus da família *Secoviridae* também foram relatados no Brasil: dioscorea mosaic associated virus (DMaV) em *Dioscorea*

sp. (família Dioscoreaceae) nos estados de Pernambuco, Paraíba e Distrito Federal; strawberry crinkle virus (SCrV) em *Fragaria x ananassa* (Rosaceae) no estado do Rio Grande do Sul; strawberry mottle virus (SMoV) em *Fragaria* sp. no estado de São Paulo (Kitajima 2020).

2.3. Viroses em brássicas: estratégias de manejo e controle

Entre os vírus descritos em brássicas, no Brasil, destacam-se o cauliflower mosaic virus (CaMV) e o turnip mosaic virus (TuMV), por serem patógenos que podem causar prejuízos econômicos, principalmente pela ausência de variedades comerciais que apresentam resistência genética a esses vírus (Shattuck 1992; Haas et al. 2002; Walsh et al. 2002; Hohn 2008; Scholtof et al. 2011; Rodrigues et al. 2015; 2019).

O CoLV era o único carlavírus descrito infectando brássicas, com ocorrência restrita ao Brasil (Costa et al. 1972; Mello et al. 1987; Belintani et al. 2002; Eiras et al. 2008). A transmissão por afídeos e o papel das plantas da vegetação espontânea, bem como a importância nos cultivos de brássicas ainda são desconhecidos para esse vírus. A epidemiologia das coinfeções com outros vírus (CaMV e TuMV), a transmissão por afídeos e o papel das plantas da vegetação espontânea, bem como os danos associados à produção nos cultivos de brássicas também são desconhecidos.

Aspectos envolvidos no entendimento da diversidade genética das populações virais, incidência, danos e epidemiologia dos vírus de brássicas têm sido estudados pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico. Com relação ao TuMV, observou-se que os isolados brasileiros apresentam elevada variabilidade genética, embora todos os isolados analisados pertençam ao patotipo I (Rodrigues et al. 2021). Análises filogenéticas revelaram que os isolados brasileiros de TuMV se agruparam nos clados world-B (subgrupos world-B2 e world-B3) e basal-BR, sendo que, neste último, houve a formação de um clado composto exclusivamente por isolados brasileiros. Além disso, análises filogenéticas e de recombinação sugerem que os isolados brasileiros de TuMV, muito provavelmente, tiveram uma origem europeia (Rodrigues et al. 2021), o que poderia ser decorrente da origem das brássicas no Brasil (Madeira et al. 2008) e a história evolutiva desse vírus (Yasaka et al. 2017; Kawakubo et al. 2021). Observou-se também uma elevada incidência do TuMV em campos de produção de couve-chinesa, no Estado de São Paulo, com perdas de mais de 60% da produção (Rodrigues et al. 2015). Em raiz-forte, além da indução de sintomas foliares de anéis cloróticos e

mosaico, o TuMV foi responsável pela redução do sistema radicular que, indiretamente, pode interferir no volume de matéria-prima necessária para a extração de peroxidase em escala industrial (Eiras et al. 2007).

Em levantamentos recentes, observou-se uma elevada incidência de plantas de nabiça sintomáticas e assintomáticas em todos os campos de produção de brássicas visitados nos Estados de Minas Gerais, Paraná e São Paulo (M. Eiras, comunicação pessoal). Confirmou-se que muitas dessas plantas que exibiam sintomas de mosaico, bolhas e deformação foliar estavam infectadas pelo TuMV (Rodrigues et al. 2021) e pelo CaMV (Rodrigues et al. 2019). Além disso, recentemente, observou-se que tanto plantas de nabiça quanto de outras espécies de brássicas da vegetação espontânea podem atuar concomitantemente como hospedeiras de vírus e de afídeos vetores, sugerindo que essas plantas podem ter influência na epidemiologia dos vírus de brássicas (dados não publicados).

Outro fator relacionado à epidemiologia dos vírus de brássicas é que, em algumas situações, o vírus infecta a planta sistemicamente, mas não há expressão de sintomas, fato que parece ser relativamente comum para muitas infecções virais (Paudel & Sanfaçan 2018). Porém, mesmo sem sintomas aparentes, a infecção pode interferir no desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, afetar a produção. Além disso, pelo fato de não exibirem sintomas e, portanto, as plantas não serem eliminadas por tratos culturais, os vírus permanecem mais tempo nos cultivos, aumentando as chances de serem transmitidos para outras plantas, o que pode levar a uma maior disseminação (Brighenti & Oliveira 2011; Jeger 2020).

A resistência genética ainda é a principal medida de controle adotada para os vírus de plantas (Eiras et al. 2018; Hull 2014). Entretanto, na ausência de variedades que apresentem algum nível de resistência genética, medidas preventivas de controle podem ser preconizadas, tais como: (i) eliminação de fontes de vírus (prevenção e erradicação de focos de infecção primária e secundária, certificação de mudas e sementes); (ii) monitoramento das populações de vetores (isolamento das plantas com barreiras naturais, utilização de armadilhas, controle químico preventivo, utilização de superfícies refletoras, óleos e repelentes); e (iii) manejo cultural (rotação de culturas e utilização de diferentes variedades) (Tomlinson 1987; Pasqual et al. 2010; Hull 2014; Eiras et al. 2018).

2.4. Influência das coinfeções e da temperatura sobre a replicação viral e sintomas

Ao receber visitas sucessivas de insetos vetores virulíferos, plantas individuais podem gerar naturalmente populações virais complexas, que podem ser de vírus pertencentes a espécies distintas ou de variantes de vírus pertencentes a uma mesma espécie (Gómez et al. 2009; Juárez et al. 2013). A presença de populações virais distintas em uma mesma planta (e inclusive nas mesmas células), denominadas coinfeções ou infecções mistas, favorece eventos de recombinação e rearranjos, que levam a um aumento da variabilidade genética viral, podendo favorecer a uma melhor adaptação do(s) vírus no ambiente (Codoñer & Elena 2008). As coinfeções (entre dois ou mais vírus) ocorrem frequentemente na natureza, e podem ser sinérgicas ou antagônicas, influenciando na expressão de sintomas, na transmissão por vetores, na replicação viral, nos efeitos citopatológicos, no movimento do(s) vírus célula a célula, e no tropismo celular (Hull 2014). O sinergismo entre diferentes vírus (e viroides) em coinfeções pode levar a um aumento da virulência, traduzida em sintomas mais severos, o que pode inclusive caracterizar novas doenças. Nessas interações, ocorre uma cooperação mútua entre os vírus, levando ao aumento da replicação viral de um dos vírus ou de ambos (Moreno & López-Moya 2020; Rubio et al. 2020). Um exemplo clássico de efeito sinérgico é a coinfeção entre o potato virus X (PVX, *Potexvirus*) e o potato virus Y (PVY, *Potyvirus*), que resulta em sintomas de necrose em tabaco (*Nicotiana tabacum*), e mosaico rugoso em variedades distintas de batata (*Solanum tuberosum*), induzindo sintomas mais severos do que os induzidos individualmente por esses vírus nessas hospedeiras (Smith 1931). Wang et al. (2009) observaram que nas coinfeções do lettuce infectious yellows virus (LIYV, *Crinivirus*) com TuMV, ocorreu um aumento da replicação viral de ambos os vírus e uma expressão de sintomas mais severos em *Nicotiana benthamiana*. Nas interações antagônicas, por outro lado, um dos vírus reduz ou inibe a replicação viral do outro. Em coinfeções entre o papaya mosaic virus (PapMV, *Potexvirus*) e o papaya ringspot virus (PRSV, *Potyvirus*) ocorreu antagonismo quando a infecção do PapMV se estabeleceu na planta 30 dias antes do PRSV. As plantas expressaram sintomas de mosaico moderado, porém o acúmulo de RNA do PapMV aumentou, enquanto do PRSV diminuiu (Mascia & Gallitelli 2016). O sinergismo e antagonismo podem operar por meio de componentes de resposta de defesa da planta. Além disso, alguns genes que codificam proteínas supressoras de silenciamento de RNA (VSRs), atuam no bloqueio da resposta de defesa baseada em RNAi (Mascia & Gallitelli 2016).

Fatores abióticos como a temperatura podem influenciar nas interações vírus-hospedeiro, modulando a expressão de sintomas, podendo afetar a resistência da planta.

Singh et al. (2018) verificaram que plantas de feijão inoculadas com o groundnut bud necrosis tospovirus (GBNV) e incubadas a 25 e 30°C expressaram necrose, havendo aumento do acúmulo de RNA viral no sítio inoculado, enquanto em temperaturas entre 15 e 20°C a expressão de sintomas e acúmulo de RNA viral diminuíram. Os efeitos da temperatura podem variar conforme o patossistema. Bananeiras infectadas pelo banana streak virus (BSV, *Badnavirus*) exibiram sintomas severos quando mantidas a 22°C, porém ao serem transferidas para temperaturas entre 28 e 35°C os sintomas diminuíram e, em alguns casos, desapareceram (Dahal et al. 1998). Plantas de trigo (*Triticum* spp.) inoculadas com o chinese wheat mosaic virus (CWVN, *Furovirus*) e mantidas a 16°C exibiram sintomas cloróticos, enquanto plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas desenvolveram manchas amarelas e clorose. Entretanto, quando mantidas a 24°C, ambas as espécies avaliadas não expressaram sintomas e, após duas semanas, as folhas e raízes recém-emergidas ficaram livres de vírus (Andika et al. 2013). Além disso, também foi observado que plantas de *N. benthamiana* inoculadas com CWMV e mantidas a 16°C por seis semanas e, após esse período, inoculadas com PVY, desenvolveram sintomas de manchas amarelas e malformação nas folhas superiores. Em seguida, após permanecerem por duas semanas a 24°C, foi detectado por *Western blotting* o aumento do acúmulo de capa proteica (CP) do CWMV nas folhas e nas raízes (Andika et al. 2013).

Outro fator que pode influenciar nos processos de indução de sintomas causados devido à influência da temperatura está relacionado ao silenciamento gênico nas interações vírus-hospedeira. Vírus bem adaptados evoluíram para codificar VSRs que impedem a ação do silenciamento de RNA das plantas hospedeiras. Zhang et al. (2012) verificaram que temperaturas mais altas (26°C) facilitaram a replicação do turnip crinkle virus (TCV, *Tombusviridae*), com VSR intacto, em *Arabidopsis*. O mesmo efeito foi observado quando realizado teste com TCV mutante sem atividade de VSR, em plantas hospedeiras com o mecanismo de silenciamento de RNA inativado. Temperaturas de crescimento de plantas a 26°C também permitiram a replicação intensa do TCV em *Arabidopsis* com mutações nos genes Dicer-Like (DCL2), Argonaute2 (ARGO2) e HEN1 RNA metiltransferase, ocasionando a morte da planta, enquanto plantas Col-0 do tipo selvagem sobreviveram e produziram sementes viáveis. Vírus recombinantes do tobacco rattle virus (TRV, *Tobravirus*) foram utilizados para estudar os possíveis efeitos da temperatura no sistema de indução do silenciamento gênico transcricional (*virus-induced transcriptional gene silencing* – ViTGS) e pós-transcricional (*virus-induced pos-transcriptional gene silencing* – ViPTGS),

usando um gene marcador de silenciamento gênico em plantas de *Nicotiana benthamiana* 16c. A partir desse estudo, observou-se que a temperatura pode modular o ViTGS por meio de pequenos RNAs secundários, além de ser prejudicado em temperaturas mais altas (29°C), inibindo a transmissão do silenciamento gênico epigenético para as próximas gerações (Fei et al. 2021).

3. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Realizar análises de viroma, identificar e caracterizar isolados coletados em campos de produção de brássicas para explorar a diversidade dos vírus que infectam brássicas em diferentes regiões do Brasil.

Objetivos específicos:

- i. Descrever a ocorrência do CoLV em áreas de produção comercial de brássicas, abrangendo quatro regiões geográficas do Brasil: Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul;
- ii. Realizar levantamento da ocorrência dos vírus CoLV, CoMMV, BnRV1, TuMV e TuYV por meio de amostragens de brássicas em áreas de cultivo de hortaliças no cinturão verde da cidade de São Paulo;
- iii. Caracterizar, por meio de análises biológicas, sorológicas e moleculares e sequenciamento completo do genoma, os vírus que infectam brássicas;
- iv. Descrever a variabilidade genética dos isolados de carlavírus que infectam brássicas por meio do sequenciamento completo dos seus genomas e análises filogenéticas;

- v. Avaliar, por meio de ensaios biológicos, em condições controladas, o efeito da temperatura na expressão dos sintomas e no desenvolvimento de variedades de brássicas inoculadas com um isolado de CoMMV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolados virais

Foram coletadas e recebidas, por meio de colaboradores, amostras de brássicas em áreas destinadas à produção de hortaliças nos Estados de Alagoas, São Paulo, Distrito Federal, Goiás e Paraná. Para viabilizar as análises biológicas, sorológicas e moleculares as amostras de espécies cultivadas e não cultivadas de brássicas foram coletadas, apresentando ou não sintomas, foram acondicionadas em sacos plásticos identificados com o nome das espécies e local da coleta e no laboratório foram triadas e receberam um código para identificação do isolado (Tabela 1).

Tabela 1: Relação das amostras de brássicas coletadas em diferentes Estados brasileiros.

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

Foram realizadas novas coletas de amostras de brássicas em áreas do cinturão verde da cidade de São Paulo destinadas à produção de hortaliças, nos municípios de Biritiba Mirim, Ibiúna e São Roque. Também foram coletadas amostras dos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Bahia. Espécies cultivadas e não cultivadas de brássicas foram coletadas, apresentando ou não sintomas, sendo acondicionadas em sacos plásticos identificados com os nomes das espécies, local e data de coleta, além de receberem um código para identificação do isolado (Tabela 2). Além disso, também foram analisadas duas amostras coletadas no município de Bragança Paulista.

Tabela 2: Relação de amostras coletadas em áreas do cinturão verde de São Paulo e de diferentes Estados brasileiros

Código	Hospedeira Nome científico/(nome popular)	Data da coleta	Procedência	Sintomas Campo
A01	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A02	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A03	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A04	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A05	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A06	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A07	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A08	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A09	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A10	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A11	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A12	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A13	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A14	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A15	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A16	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A17	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A18	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	12/05/2021	Biritiba Mirim	—
A19	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	28/07/2021	Biritiba Mirim	—
A20	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	29/07/2021	Biritiba Mirim	—
A21	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	03/08/2021	Ibiúna	—
A22	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	04/08/2021	Ibiúna	mosaico
A23	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	03/08/2021	Ibiúna	—
A24	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	03/08/2021	Ibiúna	—
A24	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	03/08/2021	Ibiúna	Mosaico
A25	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	03/08/2021	Ibiúna	—
A26	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	03/08/2021	Ibiúna	—
A27	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	03/08/2021	Ibiúna	encarquilhamento/ deformação foliar
A28	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	03/08/2021	Ibiúna	amarelecimento
A29	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	03/08/2021	Ibiúna	vermelhão nas folhas
A30	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	03/08/2021	Ibiúna	vermelhão nas folhas
A31	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	03/08/2021	Ibiúna	amarelecimento
A32	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	03/08/2021	Ibiúna	mosaico amarelo
A33	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	03/08/2021	Ibiúna	mosaico amarelo
A34	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	10/08/2021	Biritiba Mirim	clareamento de nervuras
A35	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	17/08/2021	Ibiúna	mosaico amarelo
A36	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	17/08/2021	Ibiúna	mosaico amarelo
A37	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	17/08/2021	Ibiúna	vermelhão nas folhas
A38	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	17/08/2021	Ibiúna	vermelhão nas folhas
A39	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—

A40	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A41	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A42	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A43	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A44	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A45	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A46	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A47	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A48	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	24/08/2021	Biritiba Mirim	—
A49	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (couve-chinesa)	24/08/2021	Biritiba Mirim	deformação foliar
A50	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	31/08/2021	Ibiúna	mosaico
A51	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	31/08/2021	Ibiúna	mosaico
A52	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	31/08/2021	Ibiúna	mosaico
A53	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	24/11/2021	Ibiúna	mosaico/amarelecimento
A54	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	18/11/2021	Biritiba Mirim	—
A55	<i>Lactuca</i> spp.	24/11/2021	Ibiúna	mosaico
A56	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	11/11/2021	Ibiúna	amarelecimento
A57	<i>Polygonum persicoria</i>	18/11/2021	Biritiba Mirim	manchas avermelhadas/ lesões locais
A58	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	18/11/2021	Biritiba Mirim	clareamento de nervuras
A59	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	01/12/2021	Biritiba Mirim	mosaico faixa das nervuras
A60	<i>Lactuca</i> spp.	01/12/2021	Biritiba Mirim	mosaico
A61	<i>Lactuca</i> spp.	01/12/2021	Biritiba Mirim	amarelecimento
A62	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	01/12/2021	Biritiba Mirim	amarelecimento/mosaico
A63	<i>Sonchus</i> spp.	01/12/2021	Biritiba Mirim	amarelecimento
A64	Maria pretinha	01/12/2021	Biritiba Mirim	amarelecimento
A65	<i>Losna</i>	08/12/2021	Ibiúna	mosaico
A66	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	08/12/2021	Ibiúna	mosaico/amarelecimento
A67	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	08/12/2021	Ibiúna	mosaico/amarelecimento
A68	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	08/11/2022	Itabúna, Bahia	—
A69	<i>B. rapa</i> subsp. <i>Rapa</i> (nabo)	08/11/2022	Rio Grande do Sul	mosaico
A70	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	-	Paraná	—
A71	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	-	Chapecó	—
A72	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	-	São Roque	—

Legenda: (—) sem informação disponível; (negrito) isolados selecionados para a realização dos testes descritos neste trabalho. Couve - *B. oleracea* var. *acephala*; Raiz-Forte - *Armoracia rusticana*; Couve-chinesa - *B. rapa pekinensis*; Brócolis - *B. oleracea* var. *italica*; Nabiça - *Raphanus raphanistrum*; Repolho - *B. oleracea* var. *capitata*; Alface - *Lactuca* spp.; Erva de bicho - *Polygonum persicoria*; Serralha - *Sonchus* spp.; Maria pretinha - *Solanum americanum*; Losna - *Artemisia absinthium* L.; Nabo - *B. rapa* subsp. *Rapa*. *Amostras coletadas pelo Prof. Dr. E.W. Kitajima.

4.2. Preservação dos isolados

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

4.3. Obtenção de plantas para a realização dos testes biológicos

Para a obtenção das diferentes espécies de plantas indicadoras e espécies/variedades comerciais de brássicas e de outras famílias botânicas a serem desafiadas por inoculações mecânicas, foram realizadas sementeiras em bandejas plásticas, contendo substrato previamente esterilizado (120°C por 30 minutos). As espécies/variedades desafiadas foram repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), couve-chinesa (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*), couve-de-folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*) e mostarda (*Brassica juncea*). Além disso, também foram desafiadas diferentes plantas hospedeiras como *Nicotiana benthamina*, *Nicotiana glutinosa* (6 plantas), *Physalis floridana* e *Chenopodium quinoa*.

Após a germinação, as plantas foram transplantadas para vasos de polipropileno (200 ml). Tanto as bandejas de sementeira quanto as plântulas transplantadas foram mantidas em casa de vegetação até atingirem o estágio de desenvolvimento de duas folhas verdadeiras.

4.4. Inoculação mecânica

Para as inoculações mecânicas foram utilizados como fonte de inóculo os isolados coletados em campo, bem como aqueles preservados pela técnica de desidratação em CaCl_2 , armazenados a -20°C e mantidos na coleção de vírus do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico. Todas as amostras foram maceradas com auxílio de pistilo e almofariz contendo tampão fosfato acrescido de sulfito de sódio 0,01 M, pH 6,0, na proporção de 1:5 (massa (g): volume (ml)). Como abrasivo foi adicionado carborundum aos

extratos vegetais. As inoculações foram realizadas friccionando o extrato na superfície adaxial de duas folhas de cada espécie ou variedade das plantas a serem desafiadas. Os isolados virais analisados foram inoculados nas plantas de cada espécie/variedade, sendo mantidas duas plantas como testemunhas, inoculadas apenas com tampão fosfato mais sulfato de sódio acrescido de carborundum como abrasivo. Após as inoculações, as plantas foram lavadas com água e mantidas em casa de vegetação para o acompanhamento semanal do surgimento dos sintomas. Cerca de 30 dias após as inoculações, amostras de folhas das plantas inoculadas foram coletadas para análises sorológicas e moleculares.

4.5. PTA-ELISA (*Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked Immunosorbent assay*)

As plantas coletadas no campo, bem como as inoculadas, foram submetidas ao PTA-ELISA (*plate trapped antigen - enzyme linked immunosorbent assay*) (Clark & Adams 1977). Para a realização do PTA-ELISA, foi, inicialmente, feita a adsorção do antissoro policlonal com folhas sadias de couve-chinesa, com o objetivo de se reduzirem as reações inespecíficas (reconhecimento de proteínas da planta pelo antissoro). O antissoro, que apresenta um título estimado em 1:6400, foi produzido em coelho, a partir de uma preparação purificada (a partir de plantas de couve) de um isolado de CoLV (E.W. Kitajima, comunicação pessoal). Folhas sadias de couve-chinesa foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0, acrescido de 'Tween 20' (5%) e polivinilpirrolidona (PVP) na proporção 1:10 (g:ml). Após a filtragem do extrato, realizada utilizando gaze, funil e Becker, foi adicionado o antissoro na proporção 1:6.400 (antissoro:extrato), sendo a preparação incubada a 37°C por uma hora em estufa (Quincy Lab. INC, modelo 10-140 Incubator). Em seguida, o extrato foi submetido à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos (Centrifuga Eppendorf, modelo 5417R), e ao volume final do sobrenadante adicionou-se 0,5% de soro albumina bovina (BSA).

Para avaliação por PTA-ELISA, foram coletadas 0,1 g de folhas das amostras coletadas e também das amostras das espécies inoculadas mecanicamente. Os fragmentos foliares foram macerados em tampão carbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6 (1,59 g de Na₂SO₃, 2,93 g de NaCO₃ e 0,2 g NaN₃ para 1000 mL de água destilada) na proporção de 1:10 (gramas de folha: mL de tampão). As macerações foram realizadas em saquinhos plásticos e os extratos transferidos para microtubos de 1,5 mL, sendo centrifugadas a 12.000 rpm (rotor de ângulo fixo modelo FA-45-30-11 da Centrifuga Eppendorf, modelo 5417R) por 3 minutos. Em seguida, foram aplicados 50 µL dos extratos nos poços da(s) placa(s) de PTA-ELISA

(Nunc®). Como controle positivo das reações, utilizaram-se folhas provenientes de plantas previamente infectadas com isolados (T25 e T90) de carlavírus de brássicas, e como controles negativos foram utilizadas folhas sadias de couve-chinesa. Após incubação da(s) placa(s) em estufa a 37°C por 2 h, foram feitas as lavagens (3x), utilizando tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4, acrescido de 0,5% de 'Tween20'. Em seguida, foi realizado o bloqueio, com o objetivo de se reduzir as reações inespecíficas, utilizando tampão PBSTPo pH 7,4 (tampão fosfato de sódio, tampão de lavagem e 2,0 g de polivinilpirrolidona, PVP) acrescido de 2% de leite em pó (marca comercial "molico") e incubado a 4°C por 12 h. As placas foram então lavadas (3x) com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4, acrescido de 0,5% de 'Tween20', sendo, em seguida, adicionado o antissoro (previamente adsorvido), diluído na proporção 1:6.400 (antissoro:tampão) acrescido de 0,5% de BSA. Após incubação a 37°C por 2 h, foi feita a lavagem da placa (3x) com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4, acrescido de 0,5% de 'Tween20', sendo, em seguida, adicionado o anticorpo "anti-coelho" conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma®), previamente diluído em tampão PBSTPo, na proporção 1:30.000 (antissoro conjugado:tampão). Após incubação a 37°C por 2 h, procedeu-se novamente a lavagem da placa (3x) com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4, acrescido de 0,5% de 'Tween20', e, em seguida, adicionou-se o substrato p-nitrofenilfosfato (Sigma®, USA) diluído em tampão substrato pH 9,8 (9,7 mL de dietolonamina, 0,01g de MgCl₂, 0,02 g de NaN₃ para 100 mL de água destilada). Foram realizadas 4 leituras de absorbância das amostras aplicadas na placa em triplicata com intervalo de 30 minutos (entre cada leitura) em leitor de ELISA *Microplate reader 3550UV* (Bio-Rad), com comprimento de onda selecionado em 405 nm. Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram valor três vezes superior aos valores de absorbância do(s) controle(s) negativo(s) (Clark et al. 1986). As amostras positivas foram armazenadas desidratadas em CaCl₂ a -20°C na coleção do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (LFF) do Instituto Biológico.

4.6. Extração de RNA total

As extrações de RNA total foram feitas a partir de 0,1 g de cada amostra de folhas infectadas. Com auxílio de almofariz e pistilo (previamente esterilizados), o material vegetal foi triturado na presença de nitrogênio líquido (N₂) até a obtenção de um pó bem fino. Adicionou-se 1 mL do produto comercial *TRizol® Reagent* (Invitrogen, Massachusetts, USA). As amostras foram transferidas em microtubos de 1,5 mL (novos e livres de RNAses),

devidamente identificados, sendo incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionaram-se 200 μL de clorofórmio, e os tubos foram submetidos à agitação vigorosa em *vortex* (*Vortex Gene 2*, Scientific Industries SiTM). As amostras foram então incubadas por mais 3 minutos e submetidas à centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm (rotor de ângulo fixo modelo FA-45-30-11 da Centrifuga Eppendorf, modelo 5417R) a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante (fase aquosa) para tubos novos, adicionaram-se 500 μL de álcool isopropílico (1 volume), e promoveu-se a homogeneização por inversão e, sendo os microtubos, incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e submetidos à centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O isopropanol foi descartado e os RNA precipitados foram lavados com 1 mL de etanol 70%. Em seguida, o etanol foi descartado e os tubos permaneceram a temperatura ambiente para a total evaporação do álcool. Os RNA foram ressuspensos em 40 μL de água mili-Q tratada com DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*) e armazenados a -20°C e, em alguns casos, também foram armazenados a 80°C.

4.7. RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)

A síntese das moléculas de DNA complementares (cDNA), foi realizada utilizando 3 μL das soluções de RNAs totais extraídos com *TRizol[®] Reagent* (Invitrogen), que foram transferidos para um microtubo de 0,6 μL , em presença de 50 pmoles (1 μL) de um dos oligonucleotídeos iniciadores complementares e água livre de RNAses para um volume de 10 μL . Os microtubos foram incubados a 70°C por 3 minutos e colocados imediatamente em gelo por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 μL do tampão da enzima transcriptase reversa (5x) (Promega[®], Madison, USA), 1 μL da mistura de deoxinucleotídeos, dNTPs (2,5 mM) e 1 μL (unidades totais ou concentração) da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega[®]). Esta mistura, com volume total de 25 μL , foi incubada a 37°C por 60 minutos. Para as reações de PCR foram adicionados a um microtubo de 0,6 μL , 2 μL do cDNA, 1 μL (5 U/ μL) da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]), 5 μL do tampão da enzima (10x) (Invitrogen[®]), de acordo com as recomendações e especificações do fabricante, 3 μL de cloreto magnésio (50 mM), 1 μL da mistura de dNTPs (2,5 mM), 1 μL (50 pmoles) de cada oligonucleotídeo, senso e antisenso (complementar). As amostras foram amplificadas em termociclador (PTC100, MJ Research, California, USA) e as condições para amplificação definidas conforme cada par de oligonucleotídeo utilizado (Tabela 3). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,2%, em presença de brometo de etídeo (0,01%), sob luz ultravioleta em transluminador (*Eagle EyeTM - II*, Stratagene).

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização de RT-PCR para amplificação de fragmentos dos isolados de CoLV, CoMMV, BnRV1 e TuYV.

Virus/ Porção genômica	Primer	Sequência 5'-3'	Ciclo PCR	Fragmento esperado (bp)	Referências
Carlaviruses/ ORF6	Carla-Uni -F	GGAGTAACCGAGGTGATACC	94°C / 5 min 94°C / 1 min	120	Badge et al. 1996
	OligodT-21 -R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT			
Carlaviruses /CP	Carla-CP -F	GGBYTNGGBBTNCCNCANGA	50°C / 1 min 72°C / 2 min 72°C / 2 min	940	Gaspar et al. 2008
	OligodT-21 -R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT			
CoLV	CoLV-I -F	ATGCGCCAGATCCC	4°C / ∞	363	
	CoLV-II -R	TACATGTTRACGCACAACGC			
CoLV/CP	CoLV F - CP	AACGAAAAGAGCGAGCAGGA	95°C / 2 min 95°C / 30 s 54°C / 20 s 72°C / 55 s	810	
	CoLV R - CP	CTGATTCCGATTCGCACTGC			
CoLV/ Replicase	CoLV F - Rp N	ACTGAGAAGGATGTGGTGCA	72°C / 5 min 4°C / ∞	845	
	CoLV R - Rp N	TCATCCACCACTTTCGACCAG			
	CoLV F - Rep C	GAAGTACTTACGCCTCCCCA	95°C / 2 min 95°C / 30 s 54°C / 20 s 72°C / 35 s 72°C / 5 min 4°C / ∞	486	
	CoLV R - Rep C	ACCTCCTCCTCACTCATCCT			
CoMMV/CP	CoMMV F- CP	TGCACGCRCAAAGCAAGAAGC	95°C / 2 min 95°C / 30 s 54°C / 20 s 72°C / 50 s 72°C / 5 min 4°C / ∞	669	Desenvolvido neste trabalho
	CoMMV F- CP	GTGTTCTCCACGTAATCAAAGCA			
CoMMV/ Replicase	CoMMV F- Rep C	GAGCGCTGCAACCATAGAAA	95°C / 2 min 95°C / 30 s 54°C / 20 s 72°C / 35 s 72°C / 5 min 4°C / ∞	532	
	CoMMV R-Rep C	CCGCATGAACGTGAATAGCA			
BnV1/ Propol	BnV1-Propol-F	AACAGCTATCGATGCCCTGA	95°C / 2 min 95°C / 30 s 54°C / 20 s 72°C / 60 s 72°C / 5 min 4°C / ∞	988	
	BnV1-Propol-R	TCCATCATCATAACCACGCGT			
BnV1/ CP	CPBnV-F	CCGCAAACATGAACTGGTGA	95°C / 2 min 95°C / 30 s 60°C / 20 s 72°C / 25 s 72°C / 5 min 4°C / ∞	380	
	CPBnV-R	CTTTGTTCGCGGTGTTTCAGA			
TuYV/ ORF3	TuYV1_3299-F	CGTAAGTTGCAAGTAAGGGAAAC	95°C / 60 s 95°C / 15 s 60°C / 30 s 72°C / 40 s 72°C / 3 min 4°C / ∞	~750	Congdon et al. 2019
	AS5-R	CCGGTTCYBCGTCTACCTATTTDG			

4.8. Sequenciamento automático de DNA

Produtos de DNA amplificados por PCR foram eluídos do gel de agarose com um kit de purificação (*Pure Link® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit*, Invitrogen) e ressuspendidos em água estéril, conforme as recomendações do fabricante. Após a purificação, os fragmentos de DNA foram submetidos ao sequenciamento pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al. 1997) utilizando o kit *Big Dye* e o sequenciador 3500XL (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

4.9. HTS (*High-Throughput Sequencing*) – Sequenciamento de alto rendimento, montagem e análises das sequências

Foram selecionados quatro isolados de couve-de-folha: T25 (Divinolândia/SP), T90 (proveniente de Arapiraca/AL), T107 (Pinhais/PR) e T110 (Pirenópolis/GO). Os isolados foram montados em plantas de couve-chinesa, sob condição protegida de casa de vegetação. Vinte dias após as inoculações, folhas sintomáticas e assintomáticas foram submetidas à extração de RNA total com Trizol. Os RNAs foram purificados utilizando o kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e encaminhados para o Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP) para o sequenciamento de alto rendimento geração HiSeq 2500 technology (Illumina, San Diego, USA). A montagem das sequências obtidas de HTS foi realizada utilizando o programa *Trinity software* implementado no pacote *Geneious* (versão 10.2.2) e (Kearse et al. 2012; Haas et al. 2013). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com genomas completos de outras espécies do gênero *Carlavirus*, utilizando o programa *Vector NTI Advance 11*. O Programa *Sequence Demarcation Tool* versão 1.2 (SDT) foi utilizado para o alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos dos isolados caracterizados neste trabalho com outras sequências de nucleotídeos de espécies de carlavírus e membros da família *Betaflexiviridae* depositadas no GenBank. Análises filogenéticas de máxima verossimilhança (com *bootstrap* para 1500 replicações), baseadas nos alinhamentos múltiplos de nucleotídeos, foram realizadas com o auxílio do programa MAFFT versão 7 (Kato and Standley 2013). Vale ressaltar que no GenBank, há, até o presente momento, somente duas sequências (parciais) correspondentes à porção 3' de isolados de CoLV: (i) uma delas, depositada no GenBank em agosto de 2003 pelo grupo do Dr. O. Gaspar (UNESP de São José do Rio Preto, SP) apresenta 1040 nucleotídeos e inclui a porção genômica

referente à ORF 5 (que codifica a capa proteica do vírus), a porção genômica referente à ORF 6 (proteína 11 kDa) e o terminal 3' não traduzido (código do GenBank - AY340584); (ii) e uma sequência de 120 nucleotídeos de um isolado de CoLV de raiz-forte proveniente de Divinolândia, SP, depositada em julho de 2008 pelo grupo do Dr. M. Eiras (Instituto Biológico, SP), que corresponde a parte da porção genômica (ORF 6) que codifica a proteína de 11 kDa e o terminal 3' não traduzido (código do GenBank – EU867773). Além disso, um isolado obtido a partir de folhas de repolho var. 'Esmeralda', coletada em Araucária - PR, foi enviado para sequenciamento na Universidade de Warwick, Reino Unido. Outro isolado obtido a partir de uma planta de couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) oriunda do município de Bragança Paulista/SP também foi enviado para o sequenciamento completo.

4.10. Hibridização Dot-Blot

As análises por hibridização dot-blot foram realizadas para verificar a eficiência do teste na detecção de isolados de BnRV1. Duas amostras de couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) e quatro amostras de nabiça (*Raphanus raphanistrum*), do Estado de São Paulo, que foram consideradas infectadas com resultado positivo em RT-PCR e PCR, respectivamente, foram selecionadas para as análises via dot-blot. Uma amostra de couve-chinesa infectada pelo BnRV1 foi utilizada como controle positivo. Amostras de couve-de-folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*), negativas para a presença do BnRV1, foram utilizadas como controles negativos.

4.10.1. Síntese da sonda de DNA via PCR

Inicialmente, foi realizada a síntese da molécula de DNA complementar e PCR convencional da amostra selecionada para ser utilizada como sonda, conforme item 4.7. Em seguida para a reação de PCR da sonda foram adicionados a um microtubo de 0,6 µL, 2 µL do produto de PCR, 0,4 µL (5 U/µL) da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 10 µL do tampão da enzima (10x) (Invitrogen®), de acordo com as recomendações e especificações do fabricante, 3,6 µL de cloreto magnésio (50 mM), 5 µL da mistura de dNTPdig (2,5 mM) (Roche® Life Science Products, USA), 2 µL (50 pmoles) de cada oligonucleotídeo, senso e antisenso (complementar) e 27 µL de H₂O RNase Free, para um volume final de 50 µL. A sonda foi amplificada em termociclador (PTC100, MJ Research)

e as condições para a amplificação foram definidas conforme cada par de oligonucleotídeo utilizado (Tabela 3). Os fragmentos de DNA amplificados (sonda marcada com digoxigenina) foram visualizados em gel de agarose 1,2%, em presença de brometo de etídeo (0,01%), sob luz ultravioleta em transluminador (*Eagle Eye*TM - II, Stratagene).

4.10.2. Quantificação e desnaturalização do RNA

Os RNAs extraídos das amostras foliares foram quantificados utilizando espectrofotômetro (NanoDropTM 8000, Thermo Scientific, USA). Após a quantificação, as preparações de RNA foram normalizadas por meio de diluição em água (RNase Free) para um volume final de 10 µL. Em seguida, foram adicionados 10 µl de formamida, sendo os RNAs incubados a 65°C por 15 minutos, e imediatamente transferidos para o gelo. As amostras de RNA foram aplicadas em uma membrana de náilon (Hybond® N+, CytiviaTM) (a cada 3 µl), utilizando equipamento para transferência à vácuo (Hybri-SlotTM, Life TechnologiesTM, USA). Após a aplicação das amostras, a membrana foi colocada no aparelho de fixação (*Crosslinking* de DNA e RNA) por ultravioleta (1200 KJ/cm²) para a fixação do RNA à membrana.

4.10.3. Pré-Hibridização e Hibridização

A pré-hibridização foi feita em garrafa de hibridização, adicionando 20 mL do Tampão Church (1% de albumina bovina, 1mM de EDTA, 0,5 M tampão fosfatase, 7% SDS w/v, para 1 litro de água) (previamente aquecido). Em seguida a garrafa contendo a membrana foi colocada no forno de hibridização (ProBlot Hybridization Oven, Ciencor®, BR) e mantida, em rotação baixa, a 65°C por 1 hora (ou até 12 horas). Para a hibridização, foi realizada a desnaturalização da sonda a 100°C por 10 minutos. Em seguida, o tampão foi retirado do frasco e adicionado 20 mL de Tampão Church e 50 µL da Sonda desnaturalizada, sendo mantida em rotação baixa a 65°C por 12 horas. Após esse período, foram feitas 2 lavagens de 5 minutos cada utilizando o tampão 2x SSC (10 mL de SSC 20x e 1mL de SDS 10% para 100 mL de água), e 2 lavagens de 15 minutos cada utilizando o tampão 0,5x SSC (2,5 mL de SSC 20x e 1 mL de SDS 10%, para 100 mL de água) (previamente aquecidos a 65°C), mantendo em rotação baixa a 65°C. Em seguida, a temperatura do hibridizador foi reduzida para 25°C e a membrana foi lavada por 5 minutos utilizando tampão de lavagem

(60 mL de ácido maleico 0,5 M, 9 mL de NaCl 5 M e 900 µL de Tween20, para 300 mL de água). Após a lavagem, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (2g de blocking e 20 mL de tampão ácido maleico, para 200 mL de água) por 30 minutos. A seguir, a membrana foi incubada por 30 minutos em 20 mL de solução contendo o anticorpo (20 mL de solução de bloqueio e 4 µL de Anti-DIG, sendo em seguida lavada 2 vezes por 15 minutos cada com 100 mL de tampão de lavagem. Em seguida, a membrana foi lavada 1 vez por 5 minutos com 20 mL do Tampão de Detecção e incubada no escuro, em 20 mL de solução color (100 mL de tampão de detecção e 200 µL de NBT). Os resultados expressos em precipitação (cor roxa) foram acompanhados a cada 10 minutos.

4.11. Avaliação do efeito da temperatura na infecção do CoMMV

O efeito da temperatura na expressão de sintomas e na concentração de partículas do CoMMV foi avaliado em duas espécies de brássicas: couve-chinesa (*B. rapa ssp. pekinensis*) e couve-flor (*B. oleracea var. botrytis*). O delineamento experimental foi composto por seis blocos distribuídos ao acaso, contendo 10 plantas (n=10) de couve-chinesa e 10 plantas de couve-flor com três repetições, totalizando 120 plantas. Os tratamentos denominados “I” corresponderam a 3 blocos de plantas inoculadas mecanicamente com um isolado do CoMMV, e os tratamentos “T” corresponderam aos três blocos de plantas sadias friccionadas somente com o tampão de inoculação (Figura 6). As inoculações mecânicas foram realizadas com extrato de folhas de couve-chinesa infectadas com um isolado de CoMMV, preparado em tampão de inoculação e abrasivo (ver item 4.4) na proporção de 1:10 (g: mL). Foram inoculadas duas folhas por plântula, sendo pipetados 200 µL de extrato por folha (obs.: as inoculações mecânicas foram feitas pela mesma pessoa). As plantas dos tratamentos “T” também tiveram duas folhas inoculadas. Dois experimentos com regimes de temperaturas diferentes foram conduzidos durante 30 dias: (i) 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 20°C; e (ii) 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C (Figura 4). As avaliações foram semanais levando-se em conta: (i) altura das plantas; (ii) área foliar; (iii) número de folhas e (iv) sintomas. Ao final do experimento, foram avaliados outros parâmetros, tais como: (i) peso fresco e seco das plantas; e (ii) presença (ou não) de sintomas na parte aérea. Os discos coletados foram acondicionados em sacos plásticos (mantidos a 4°C para PTA-ELISA) e em microtubos de 1,5 mL (congelados a 80°C) para as extrações de RNAs totais. A área foliar das plantas foi avaliada, semanalmente, com o auxílio do aplicativo *Easy Leaf*, disponível para *smartphones* com sistema operacional *Android*. As análises dos dados foram feitas

utilizando o programa RStudio com a técnica estatística de análise de variância (ANOVA) com o modelo estatístico de delineamento de blocos casualizados (DBC).

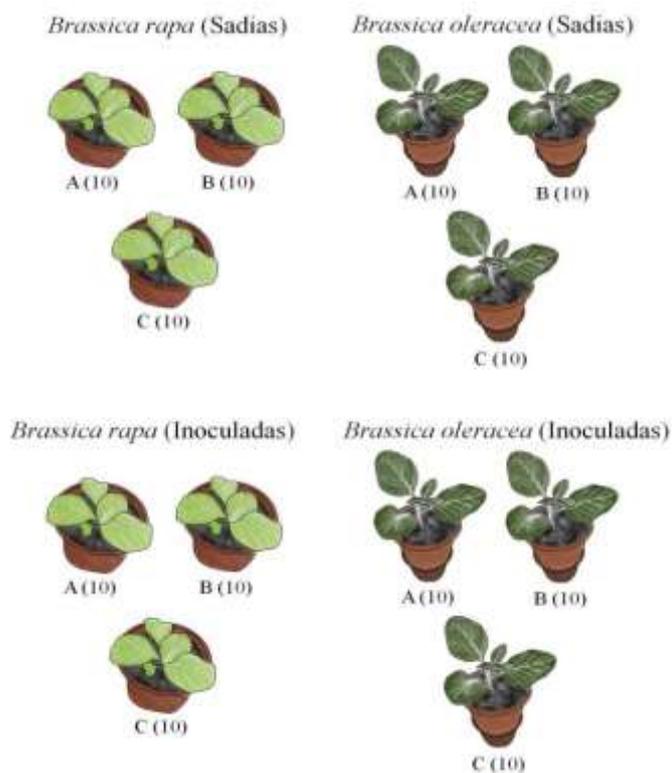


Figura 6: Esquema ilustrativo do desenho experimental para avaliação do efeito da temperatura na expressão dos sintomas induzidos pelo cole mild mosaic virus (CoMMV) em plantas de couve-chinesa (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) e couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*).

5. RESULTADOS

5.1. Análise de viromas a partir do sequenciamento completo de alto rendimento (HTS)

As análises de viroma foram realizadas para identificar e explorar a diversidade de vírus associados às brássicas simultaneamente nos campos de produção do cinturão verde da cidade de São Paulo e de outras regiões do Brasil. Ao todo foram selecionadas seis amostras de folhas de couve-de-folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*), sendo uma amostra do Distrito Federal (DF), uma amostra de Goiás (GO), uma do Paraná (PR) e três amostras de São Paulo (SP). As análises de bioinformática das bibliotecas de HTS confirmaram a presença de genomas completos de dois carlavírus, um polerovírus, um waikavírus e um cytorhabdovírus (provavelmente uma espécie nova), além da presença de fragmentos de caulimovírus e potyvírus nessas amostras.

Com os resultados obtidos a partir da amostra de couve-de-folha do DF, observou-se que do total de 12.260.632 milhões de pares de leituras, apenas 3.203.115 milhões foram classificados. Cerca de 26% dos pares de leituras foram classificados entre bactérias, eucariotos e vírus, sendo que 0,08% (2.667 mil pares de leitura) corresponderam a sequências de vírus pertencentes a diferentes espécies. Nesta amostra, foram detectados 152 pares de leitura referentes ao turnip mosaic virus (TuMV) e 70 pares de leitura do cole mild mosaic virus (CoMMV). A análise de viroma da amostra de couve-de-folha do PR indicou que dos 15.279.563 milhões de pares de leitura obtidos, apenas 0,7% (99.560 mil pares de leitura) corresponderam a sequências de vírus, sendo que 79% (78.746 mil pares de leitura) corresponderam a sequências do CoMMV, 5% (4.929 mil pares de leitura) corresponderam ao CoLV, 2% (1.058 mil pares de leituras) corresponderam a fragmentos de outros carlavírus (não identificados) e 2% corresponderam a outros vírus. Além disso, também foram detectadas 1.205 leituras de fragmentos de sequências de CaMV. As análises de bioinformática das bibliotecas da amostra de couve-de-folha coletada no Estado de Goiás mostraram que dos 12.498.594 milhões pares de leituras obtidos no sequenciamento, apenas 3.600.417 milhões de leituras foram classificadas entre bactérias (19%), eucariotos (6%) e vírus (2%), sendo 71% do total consideradas leituras que não puderam ser classificadas. Dos 2% (205.071 mil pares de leituras) referentes às sequências pertencentes a vírus, cerca de 70% (144.077 mil pares de leituras) corresponderam ao CoMMV, 18% (36.592 mil reads) corresponderam a sequências do CoLV, 2% (1.759 mil pares de leituras) corresponderam a

fragmentos de outros carlavírus e 8% (15.227 mil pares de leituras) foram fragmentos de sequências não classificadas.

Em duas amostras de couve-de-folha provenientes de Bragança Paulista/SP, foi detectada a presença de TuMV e BnRV1. Na primeira amostra, dos 14.103.747 milhões de pares de leitura, apenas 4.712.783 foram classificados entre bactérias, fungos e vírus, sendo 14% correspondentes a fragmentos de vírus. Dos fragmentos virais, 78% (1.567.691 pares de leitura) corresponderam ao TuMV e 2% (38.452 pares de leituras) corresponderam ao BnRV1, sendo o restante correspondente a pequenos fragmentos de sequências ou de espécies não classificadas. Na segunda amostra, dos 13.459.499 de pares de leitura, apenas 4.646.582 foram classificados. Do total de pares de leituras classificados, 11% (1.511.396) foram referentes a sequências ou fragmentos de vírus, sendo 79% (1.187.835 pares de leitura) correspondentes a fragmentos do TuMV e 3% (39.460 pares de leitura) a sequências do BnRV1. Os valores restantes foram referentes a fragmentos não classificados.

Na amostra de São Paulo proveniente da cidade de São Roque, foram obtidos 18.222.337 milhões de pares de leitura, sendo que destes apenas 5.401.288 pares de leituras foram classificados entre fungos, bactérias e vírus (30%). Nessa amostra, foram detectados fragmentos de CoLV (926.818 pares de leitura), CoMMV (375.470 pares de leitura), BnRV1 (214.276 pares de leitura) e TuYV (4.284 pares de leitura). Além disso, também foi obtida a sequência completa de um cytorhabdovírus [cabbage cytorhabdovirus 1, CCyV-1 (Pecman et al. 2017)] a partir de 550 pares de leitura obtidos.

5.1.2. Sequenciamento e análises das sequências²

A partir de análises de bioinformática das bibliotecas de HTS obtidas, confirmou-se a presença de genomas completos de carlavírus nas quatro amostras sequenciadas. De acordo com as análises de identidade das sequências de nucleotídeos (nt), o carlavírus presente na amostra T90 divergiu das sequências de carlavírus analisadas dos isolados T25, T107 e T110, que apresentaram maior porcentagem de identidade de nt entre si. O RNA genômico dos isolados virais sequenciados consistiram de cerca de 8.550 nucleotídeos (8.557 para o isolado T25, 8.524 para o T90, 8.543 para o isolado T107 e 8.746 para o isolado T110), todos

² Resultados publicados em: OLIVEIRA, A.M.; RODRIGUES, L.K.; CHABI-JESUS, C.; CHAVES, A.L.R.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; BANGUELA-CASTILLO, A.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; EIRAS, M. Biological and molecular characterization of two closely related carlaviruses affecting brassica plants. *Plant Pathology*, v. 71, p. 479–493, 2022. <https://doi.org/10.1111/ppa.13472>

com seis ORFs, apresentando uma organização genômica típica dos carlavírus: ORF 1 (replicase), ORFs 2, 3 e 4 (*triple gene block*), ORF 5 (CP) e ORF 6 (proteína de 11 kDa), além do terminal 3' não traduzido poliadenilado (Figura 7).

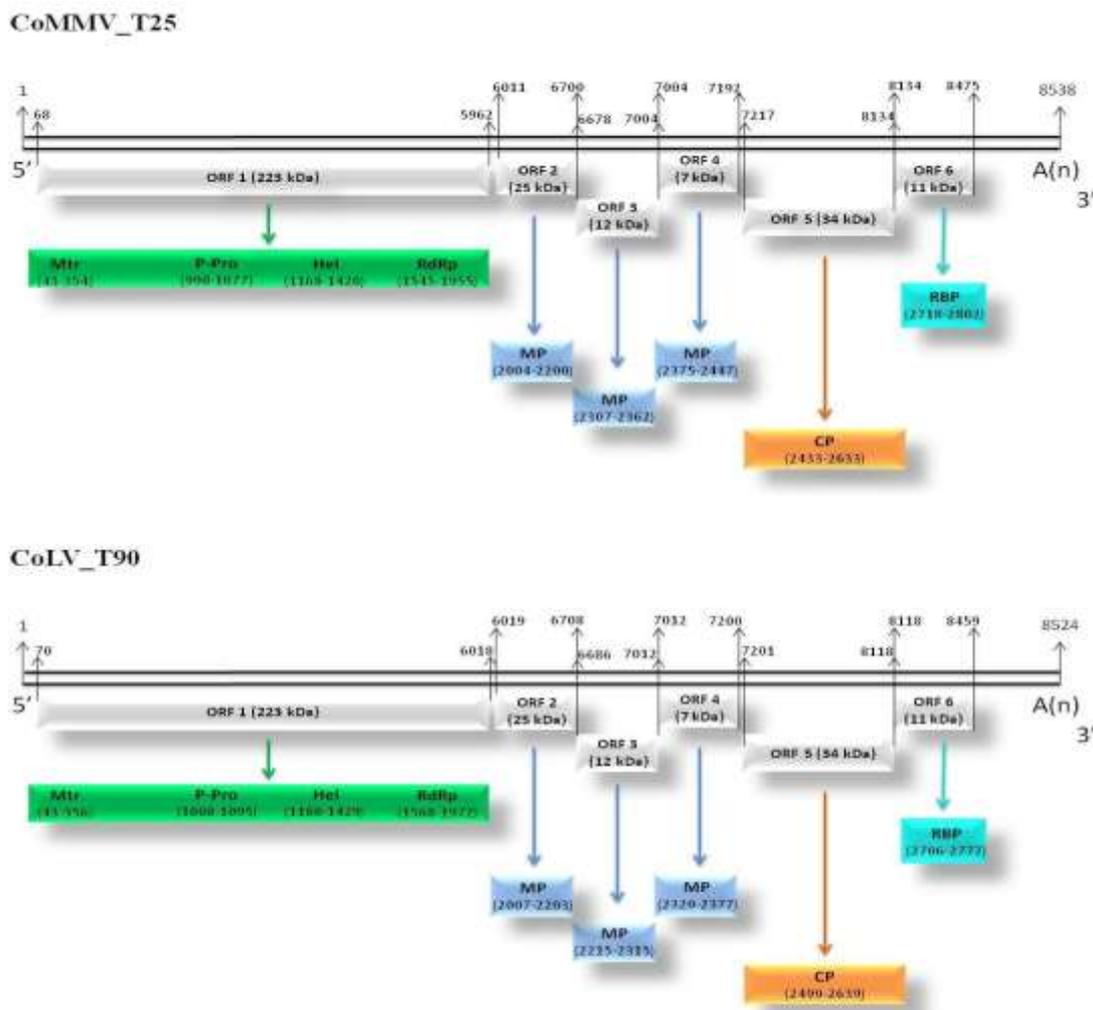


Figura 7: Organizações genômicas dos dois isolados (SP) de carlavírus: cole mild mosaic virus (CoMMV_T25) e cole latent virus (CoLV_T90). As caixas indicam a posição de cada ORF: **ORF 1**, codifica a replicase viral, proteína com 223 kDa com quatro domínios [metiltransferase (Mtr), *papain-like protease* (PPro), helicase (Hel) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)]; **ORFs 2, 3 e 4**, formam o triplo bloco gênico (*Triple Gene Block*, TGB) que codificam proteínas associadas ao movimento do vírus célula a célula (MP); **ORF 5**, codifica a capa proteica (CP) do vírus; e **ORF 6** codifica uma proteína rica em cisteína (*RNA-Binding Protein*, RBP), com atividade associada à supressão de silenciamento gênico. As ORFs do terminal 3' são traduzidas por dois RNAs subgenômicos, sgRNA de 1,3 kb e 2,6 kb (que não são encapsidados).

Nas análises realizadas com base na porcentagem de identidade entre os isolados sequenciados e outros carlavírus, foi possível verificar que os genomas dos isolados T25 e T90 apresentaram 68,0% de identidade de nt entre si, e as porcentagens de identidade das sequências de nt mais altas, 78,6% e 85,2%, respectivamente, com o único fragmento

genômico conhecido, aproximadamente 1 kb da extremidade 3' do RNA, de CoLV (NCBI RefSeq NC_038322) (Belintani et al. 2002). Considerando a ORF5 da sequência de CoLV disponível (642 nt, aproximadamente dois terços deste gene em carlavírus), os fragmentos correspondentes nos genomas de T25 e T90 possuem 78,0% e 81,5% de identidade de nt e 97,6% e 99,2% de identidade de aminoácidos (aa), respectivamente. A ORF6 (342 nt) de CoLV, a única ORF completa conhecida desse isolado, possui maior porcentagem de identidade com o isolado de T90 (nt: 90,8% e aa: 92,1%) do que com o isolado de T25 (nt: 77,6% e aa: 77,2%).

Dada a maior porcentagem de identidade do isolado T90 com o único fragmento de CoLV conhecido (RefSeq NC_038322), do que com a sequência genômica do isolado T25, T90 foi considerado um isolado de CoLV, enquanto que o isolado T25 foi atribuído a uma possível espécie nova de carlavírus denominada cole mild mosaic vius (CoMMV). As sequências completas do genoma de CoMMV_T25 e CoLV_T90 foram depositadas no GenBank como acessos MK684348 e MK770418, respectivamente. As sequências genômicas dos isolados T107 e T110 compreendem 8.543 nt (acesso GenBank MZ189739) e 8.546 nt (MZ189738), respectivamente, e possuem uma maior porcentagem de identidade de nt (> 92%) quando comparados com o genoma de CoMMV_T25, enquanto que com o genoma de CoLV_T90, os valores são inferiores a 68,0% (Tabela 3). Os perfis de identidade dos isolados T107 e T110 são quase idênticos e mostram a mesma tendência dos perfis mostrados pela comparação entre CoMMV_T25 e CoLV_T90. Os perfis de identidade da comparação entre os genomas de T107 e T110 com CoMMV_T25, exceto para três regiões na primeira metade do ORF1, estão sempre acima de 90% de identidade. De acordo com esses resultados, T107 e T110 foram considerados isolados de CoMMV (Tabela 4).

Os genomas de CoMMV_T25 e CoLV_T90 também foram comparados com as sequências de carlavírus disponíveis. Quando as ORFs foram analisadas de forma independente, os valores de identidade de nt e aa foram inferiores a 71,3% e 75,7%, respectivamente (Tabela 3). A ORF1 e ORF5 de CoMMV_T25 e CoLV_T90 apresentaram as maiores porcentagens de identidade com as sequências dos carlavírus potato virus M (PVM) e narcissus common latent virus (NCLV). Os valores correspondentes à ORF5 foram sempre os mais altos.

Tabela 4: Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre cole mild mosaic virus (CoMMV) isolado T25, cole latent virus (CoLV) isolado T90, isolado T107 (CoMMV) e isolado T110 (CoMMV), e de alguns vírus selecionados das subfamílias *Quinvirinae* e *Trivirinae*. Os maiores valores de porcentagens de identidade entre CoMMV e CoLV estão destacados em negrito e sublinhados.

Gênero/ Subfamília	Vírus (número de acesso no GenBank)	Porcentagem de identidade (%)							
		Replicase (ORF1)		Capa proteica (ORF5)		Proteína rica em cisteínas (ORF6)		Genoma	
		CoMMV ^a	CoLV ^b	CoMMV	CoLV	CoMMV	CoLV	CoMMV	CoLV
		nt/aa	nt/aa	nt/aa	nt/aa	nt/aa	nt/aa	nt	nt
<i>Carlavirus/ Quinvirinae</i>	CoMMV_T25 (MK684348)	-	66.7/ 71.1	-	73.8/ 83.8	-	76.3/ 77.8	-	68.0
	CoLV_T90 (MK770418)	66.7/ 71.1	-	73.8/ 83.8	-	76.3/ 77.8	-	68.0	-
	CoLV (AY340584)	-	-	78.0/ 97.6 ^c	81.5/ 99.2^c	77.6/ 77.2	90.8/ 92.1	78.6 ^d	85.2^d
	CoMMV_T107 (MZ189739)	92.6/ 95.9	68.2/ 71.1	93.4/ 95.4	73.8/ 83.4	96.2/ 98.2	77.6/ 78.8	92.9/ 76.6	69.0/ 59.8
	CoMMV_T110 (MZ189738)	91.9/ 95.3	67.7/ 71.3	92.4/ 95.1	74.4/ 83.1	96.8/ 99.1	77.0/ 77.9	92.4/ 76.3	68.7/ 36.8
	Aconitum latent virus (AB051848)	60.1/ 55.4	59.3/ 55.7	65.7/ 72.7	66.8/ 71.3	44.7	43.0	60.0	59.9
	Narcissus common latent virus (AM158439)	<u>61.9/</u> 60.0	61.2/ 60.0	68.1/ 74.6	66.2/ 73.9	52.6	48.2	<u>62.4</u>	61.4
	Potato virus M (D14449)	61.6/ <u>60.9</u>	<u>62.4/</u> <u>60.1</u>	<u>69.4/</u> <u>75.7</u>	<u>71.3/</u> <u>75.0</u>	51.8	49.1	62.0	<u>63.3</u>
<i>Foveavirus/ Quinvirinae</i>	Apple stem pitting virus (KY242757)	54.5/ 44.0	53.7/ 42.5	48.5/ 31.4	52.6/ 32.9	-	-	53.9	52.0
<i>Robigovirus/ Quinvirinae</i>	Cherry necrotic rusty mottle virus (EU188438)	51.5/ 38.7	51.9/ 37.4	48.4/ 30.9	51.1/ 29.6	-	-	51.7	51.7
<i>Capillovirus/ Trivirinae</i>	Apple stem grooving virus (KX686100)	48.8/ 33.5	50.7/ 33.3	62.4/ 21.7	62.2/ 23.1	-	-	51.5	50.9
<i>Trichovirus/ Trivirinae</i>	Apple chlorotic leaf spot virus (KU960942)	50.1/ 34.4	51.6/ 36.0	53.5/ 29.5	55.1/ 27.5	-	-	50.0	50.2
<i>Vitivirus/ Trivirinae</i>	Grapevine virus A (AF007415)	50.6/ 32.7	51.2/ 33.4	54.8/ 25.9	52.1/ 27.0	-	-	50.0	50.0

^aIsolado T25; ^bisolado T90; ^cComparação envolvendo apenas 642 nts, o que corresponde a aproximadamente dois terços da ORF5 dos carlavírus; ^dFragmento de 1.040 nucleotídeos disponível em GenBank de um isolado de CoLV identificado no Brasil, em 2002.

Análises filogenéticas das sequências de aminoácidos deduzidos da replicase e da capa proteica de membros da família *Betaflexiviridae* revelaram dois grandes ramos, separando os membros das subfamílias *Quinvirinae* e *Trivirinae*. Os isolados de CoMMV

(CoMMV_T25, CoMMV_T107 e CoMMV_T110) e o isolado de CoLV (CoLV_T90) ficaram agrupados em um subclado onde PVM também foi incluído (Figura 8 e 9). Na árvore filogenética, construída a partir da porção genômica da capa proteica, a sequência correspondente ao isolado de CoLV (NC_038322), descrito em 2002, também foi incluído (Figura 7).

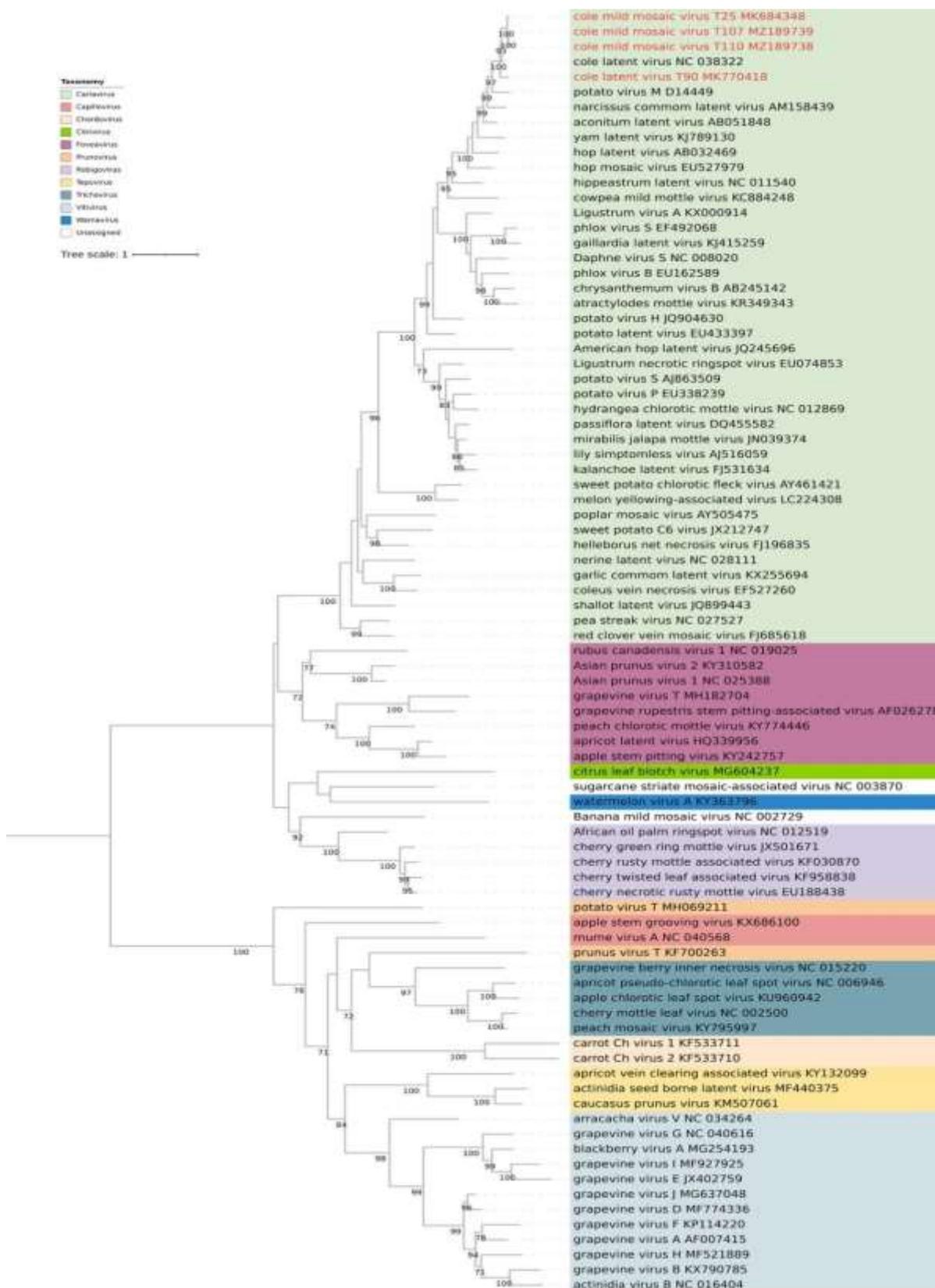


Figura 8: Árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida a partir do alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos da ORF 5, que codifica a capa proteica (CP), de espécies da família *Betaflexiviridae* (subfamílias *Quinvirinae* e *Trivirinae*). Valores de suporte de *bootstrap* (1500 replicações) de ramos superiores a 70% são indicados perto dos nós correspondentes. Os isolados de cole latent virus e cole mild mosaic virus estão destacados em vermelho. Figura publicada no trabalho de OLIVEIRA et al. (2022).

A partir das sequências de nucleotídeos dos genomas completos do CoLV e do CoMMV, diferentes pares de *primers* foram desenhados para as porções genômicas correspondentes à capa proteica (CP) e replicase (RdRp – Rep C) de cada vírus (Tabela 4). As amostras anteriormente analisadas por RT-PCR com resultados positivos apenas para o CoLV foram submetidas a novas análises moleculares para verificar a possível ocorrência do CoMMV nessas amostras. Foram identificadas por RT-PCR coinfeções por CoLV e CoMMV nas amostras T4, T6, T9, T25, T36, T63 e T89, enquanto nas amostras T15, T62, T107 e T110 foi detectada a presença apenas do CoMMV. Na amostra T90 foi detectada a presença apenas do CoLV (Tabela 5, Figuras 10 e 11).

Tabela 5: Amostras de brássicas provenientes de diferentes localizações geográficas e a identificação por meio de RT-PCR com *primers* específicos para o cole latent virus (CoLV) e cole mild mosaic virus (CoMMV).

Código	Nome Científico	Nome vulgar	Origem	CoLV		CoMMV	
				RT-PCR		RT-PCR	
				CP	REP-C	CP	REP-C
T4 (1)	<i>Brassica oleracea</i>	Couve	Socorro (SP)	+	+	+	+
T6 (2)	<i>Aarmoracia rusticana</i>	Raiz-Forte	Divinolândia (SP)	+	+	+	+
T9 (3)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Monte Alegre do Sul (SP)	-	+	+	+
T15 (4)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Distrito Federal (DF)	-	-	+	+
T25 (5)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Divinolândia (SP)	+	+	+	+
T36 (6)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Sto Antônio do Pinhal (SP)	+	+	+	+
T62 (7)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Pindamonhangaba (SP)	-	-	+	-
T63 (8)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Pindamonhangaba (SP)	+	+	+	-
T64 (9)	<i>B. oleracea</i>	Brócolis	Pindamonhangaba (SP)	-	-	-	-
T89 (10)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Ubatuba (SP)	+	+	+	+
T90 (11)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Arapiraca (AL)	+	+	-	-
T107 (12)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Pinhais (PR)	-	-	+	-
T109 (13)	<i>R. raphanistrum</i>	Nabiça	Pirenópolis (GO)	-	-	-	-
T110 (14)	<i>B. oleracea</i>	Couve	Pirenópolis (GO)	-	-	+	+

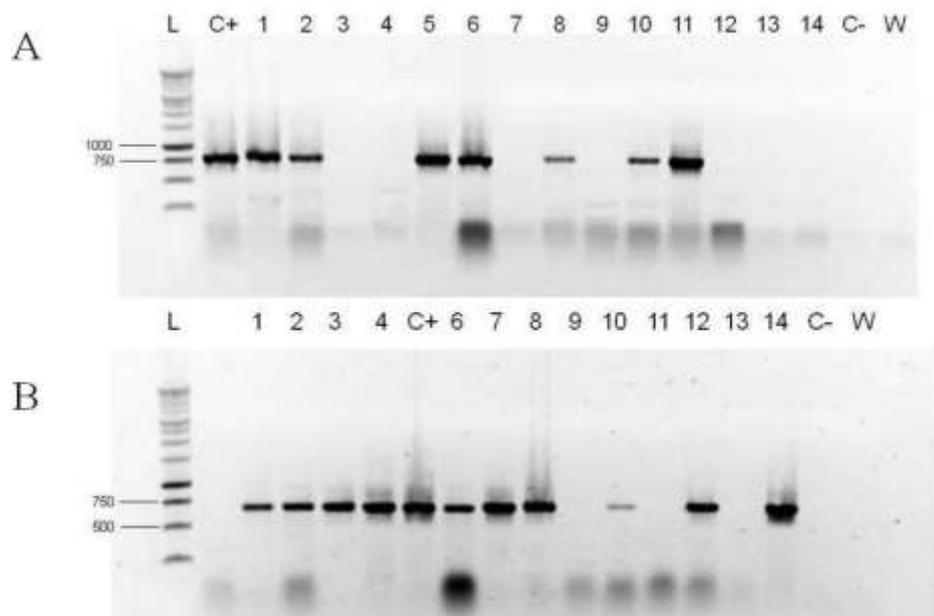


Figura 10: Resultados da detecção do CoLV e CoMMV por RT-PCR utilizando *primers* para a porção genômica correspondente à capa proteica (CP). Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos amplicons para detecção de CoLV- fragmento de 810 pb - (A) e CoMMV- fragmento de 669 pb - (B). Linhas 1-14: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 5. C +: folhas de couve infectadas. C -: couve-de-folha sadia. W: branco da reação. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 1 kb, Promega, EUA).

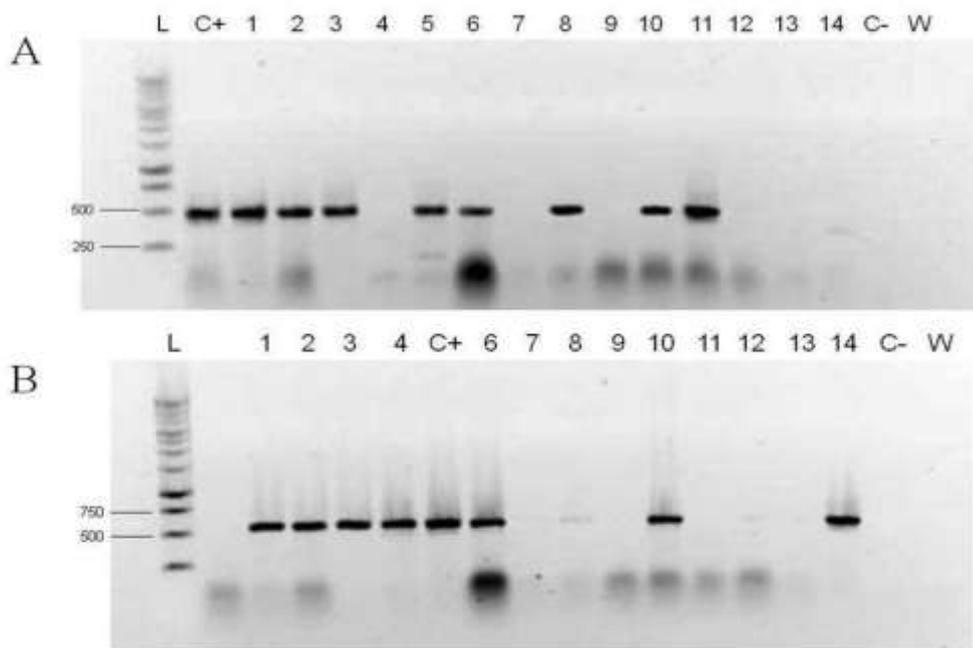


Figura 11: Resultados da detecção do CoLV e CoMMV por RT-PCR utilizando *primers* para a porção genômica correspondente a replicase (RdRp). Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos amplicons para detecção de CoLV- fragmento de 486 pb - (A) e CoMMV- fragmento de 532 pb - (B). Linhas 1-14: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 5. C +: folhas de couve infectadas. C -: couve-de-folha sadia. W: branco da reação. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 1 kb, Promega, EUA).

5.1.3. BnRV1³: Sequenciamento, análises das sequências e filogenia

O RNA genômico do isolado viral sequenciado consistiu de cerca de 12.313 nucleotídeos. Na análise realizada com base na porcentagem de identidade de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa), a partir da sequência completa do genoma, foi possível verificar que o genoma do isolado brasileiro, *brassica napus* RNA virus 1 – Brasil – BR, quando comparado com a sequência genômica de nucleotídeos do isolado coreano BnRV1 (NCBI Ref. Seq. NC_040586), apresentaram 100% de identidade entre si. Além disso, o isolado brasileiro também foi comparado com outros vírus pertencentes à família *Secoviridae*. As maiores porcentagens de identidade de aa, quando se comparou o BnRV1 com outros vírus do gênero *Waikavirus*, foram observadas entre as sequências de bellflower vein chlorosis virus (BVCV) e rice tungro spherical virus (RTSV) (Tabela 6; Figura 12).

Análises filogenéticas das sequências de aminoácidos deduzidos da Pro-Pol, de membros da família *Secoviridae*, revelaram ramos separando os membros de cada gênero. Além disso, o isolado coreano do BnRV1 e o isolado brasileiro (*brassica napus* RNA virus 1 – Brasil – BR) ficaram agrupados no mesmo clado (Figura 12).

³ A ocorrência desse vírus em território nacional foi oficialmente comunicada ao Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Vegetais da Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Tabela 6: Porcentagem de identidade de aminoácidos entre o isolado brasileiro brassica napus RNA virus 1 (BnRV1 – Brasil - BR) e outros membros da família *Secoviridae*.

Gênero	Vírus (número de acesso no GenBank)	Porcentagem de identidade de aa (%)
		Propol
		BnRV1 (Brasil – BR)
<i>Waikavirus</i>	brassica napus RNA virus 1 (NC_040586.1)	<u>100</u>
	bellflower vein chlorosis virus (NC_027915.1)	67.10
	maize chlorotic dwarf virus (MH713426.1)	53.19
	rice tungro spherical virus (NC_001632.1)	<u>59.17</u>
<i>Sequivirus</i>	carrot necrotic dieback virus strain Anthriscus (EU980442.1)	38.20
	dandelion yellow mosaic virus isolate RNA24P-2 (MT559283.1)	39.58
	parsnip yellow fleck virus (NC_003628.1)	32.58
<i>Sadwavirus</i>	chocolate lily virus A isolate KP2 segment RNA1 (JN052073.1)	26.32
	dioscorea mosaic associated virus isolate 269 (KX714933.1)	31.58
	satsuma dwarf virus RNA 1 (NC_003785.2)	27.95
	black raspberry necrosis virus RNA1 (NC_008182.1)	27.15
	strawberry mottle virus RNA1 (NC_003445.1)	27.74
<i>Torradovirus</i>	carrot torradovirus 1 (NC_025479.2)	34.81
	lettuce necrotic leaf curl virus RNA1 (NC_035214.1)	34.88
	motherwort yellow mottle virus RNA1 (NC_035218.1)	36.93
	squash chlorotic leaf spot virus RNA1 (NC_035221.1)	30.71
	tomato marchitez virus isolate M segment RNA1 (KT756874.1)	30.57
	tomato torrado virus RNA1 (NC_009013.1)	27.15
<i>Cheravirus</i>	apple latent spherical virus segment 1 (NC_003787.1)	31.93
	arracacha virus B strain PX segment RNA1 (MK153135.1)	31.40
	cherry rasp leaf virus isolate tom segment RNA-1 (MK952187.1)	30.57
	currant latent virus segment RNA1 (KT692952.1)	33.95
	stocky prune virus segment RNA-1 (NC_043388.1)	30.59
Unassigned	strawberry latent ringspot virus RNA1 (NC_006964.1)	28.35

Legenda: O maior valor entre os dois isolados de BnRV1 está destacado em negrito e sublinhado.

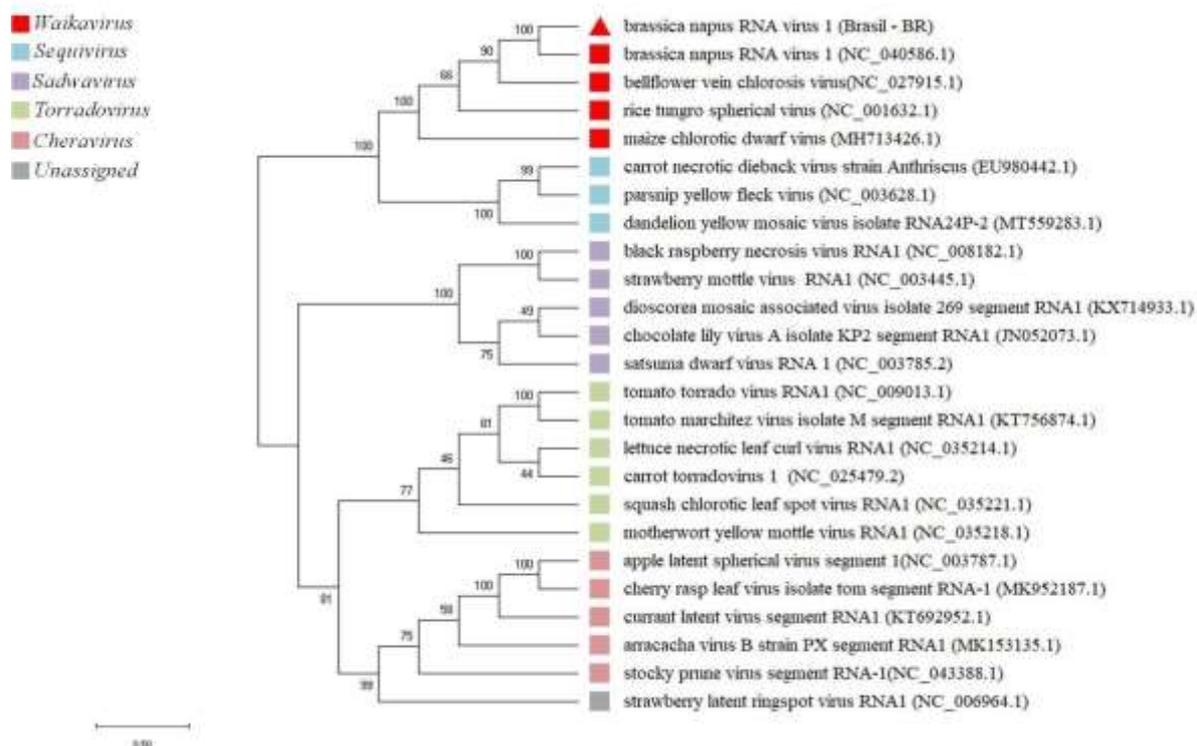


Figura 12: Árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida a partir do alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos da Pro-Pol (Pro-proteinase, Pol-RNA polimerase dependente de RNA – RdRp) de espécies da família *Secoviridae*. O triângulo vermelho indica o isolado brasileiro de BnRV1 (brassica napus RNA virus 1 – Brasil-BR). Valores de suporte de *bootstrap* (1500 replicações) de ramos superiores a 50% são indicados perto dos nós correspondentes.

5.1.4. TuYV: Sequenciamento, análises das seqüências⁴

A seqüência completa do RNA genômico do isolado de TuYV, obtido a partir de folhas de repolho var. ‘Esmeralda’, coletada em Araucária, PR (Figura 13), foram montadas com uma sobreposição de 40 nucleotídeos em cada extremidade das seqüências para revelar o genoma completo de 5615 nucleotídeos (nt). Este isolado brasileiro compartilhou a maior porcentagem de identidade de nt 93,6% com o isolado australiano TuYV MK107 (MT586590.1) de *Brassica napus*. Todas as ORFs foram identificadas sendo a ORF0 (32-781 nt), ORF1 (174-1997 nt), com uma recodificação traducional em 1556 nt para produzir ORF1+2 (174-3280 nt), a ORF3a (3366-3503 nt), ORF3 (3484-4092 nt), leitura de um códon de parada em 4090nt para produzir ORF3+5 (3484-5493 nt) e ORF4 (3515-4042 nt). A proteína P3 do isolado brasileiro (ORF3, a proteína TuYV mais conservada) compartilhou

⁴ Resultados publicados em: Greer, S. F., Newbert, M. J., Rodrigues, L. K., Oliveira, A. M., Chaves, A. L. R., Calegario, R. F., Barker, G.C., Eiras, M., Walsh, J.A. 2021. First report of turnip yellows virus in Brazil. New Disease Reports.

92,6% de identidade de sequência de aminoácidos (aa) com a de MK107 e a porção genômica correspondente a capa proteica (região P5 da ORF3+ORF5) compartilhou 95,7% identidade de sequência de aa com a de MK107.



Figura 13: Vista geral de uma área de produção comercial de repolho no município de Araucária, PR. Observa-se uma única planta exibindo sintoma de avermelhamento foliar. (2) Detalhe de uma planta de repolho var. “Esmeralda” infectada por um isolado brasileiro do turnip yellows virus (TuYV) com sintoma de avermelhamento das folhas baixas. (3) Área próxima do cultivo de repolho com elevada infestação de plantas de nabiça (*Raphanus raphanistrum*). (4) Detalhe de uma planta de nabiça com mosaico amarelo, sintoma característico induzido pelo TuYV.

5.2. Análises sorológicas (PTA-ELISA) e RT-PCR das amostras coletadas no cinturão verde da cidade de São Paulo

Após a detecção da presença do cole latent virus (CoLV) e do cole mild mosaic virus (CoMMV), em infecções simples e mistas, nas amostras coletadas em diferentes regiões do Brasil (Tabela 6), novas amostras foram coletadas em áreas de produção de brássicas do cinturão verde de São Paulo, especificamente nos municípios de Ibiúna e Biritiba Mirim. No total foram coletadas 72 amostras (Tabela 2). A maioria das amostras coletadas era assintomática (amostragem aleatória), porém algumas das amostras expressavam sintomas como mosaico, amarelecimento, clareamento de nervuras e avermelhamento foliar (Figura 14).

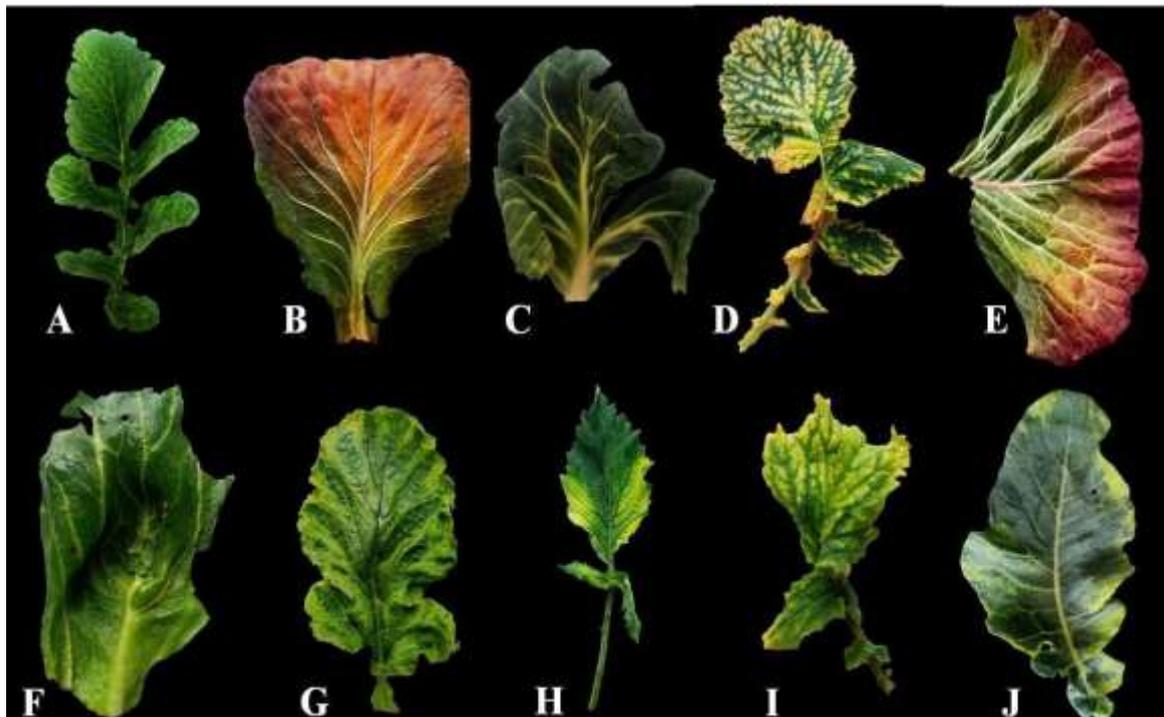


Figura 14: Amostras de folhas de brássicas com sintomas coletadas em campos de produção comercial do cinturão-verde de São Paulo. (A) Folha de nabiça (*Raphanus raphanistrum*) com mosaico, infectada com TuMV; (B) Folha de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) com avermelhamento, infectada com TuYV; (C) Folha de repolho com clareamento de nervuras, com coinfeção entre TuMV, BnRV1 e TuYV; (D) Folha de nabiça com mosaico e amarelecimento, infectada pelo TuYV; (E) e (F) Folhas de repolho com avermelhamento e clareamento de nervuras, respectivamente, infectadas com TuYV; (G) Folha de nabiça com mosaico, com coinfeção entre TuMV e BnRV1; (H) Folha de nabiça com amarelecimento, com coinfeção entre TuYV e BnRV1; (I) Folha de nabiça com mosaico e amarelecimento, infectada com TuYV, TuMV, BnRV1 e CoMMV; (J) Folha de brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) com amarelecimento, com coinfeção entre CoMMV e TuYV.

A identificação das espécies virais presentes nas amostras de brássicas, em infecções simples ou em coinfeções, foi realizada por meio de RT-PCR com primers específicos tanto para a detecção BnRV1 e TuYV, como para a detecção do cole CoLV, CoMMV e o TuMV. A maioria das amostras de couve-de-folha coletadas eram assintomáticas, exceto as amostras A66 e A67, que exibiam mosaico e amarelecimento foliar (Tabela 6, Figura 15). As amostras foram submetidas a análises sorológicas e moleculares para a detecção da presença de CoLV e CoMMV. As primeiras 52 amostras (A01 a A52) foram submetidas a análises sorológicas, por meio de PTA-ELISA com um antissoro policlonal específico para o CoLV, e moleculares via RT-PCR com primers específicos para o CoLV e CoMMV. As demais amostras (A53 a A72) foram submetidas apenas a RT-PCR.

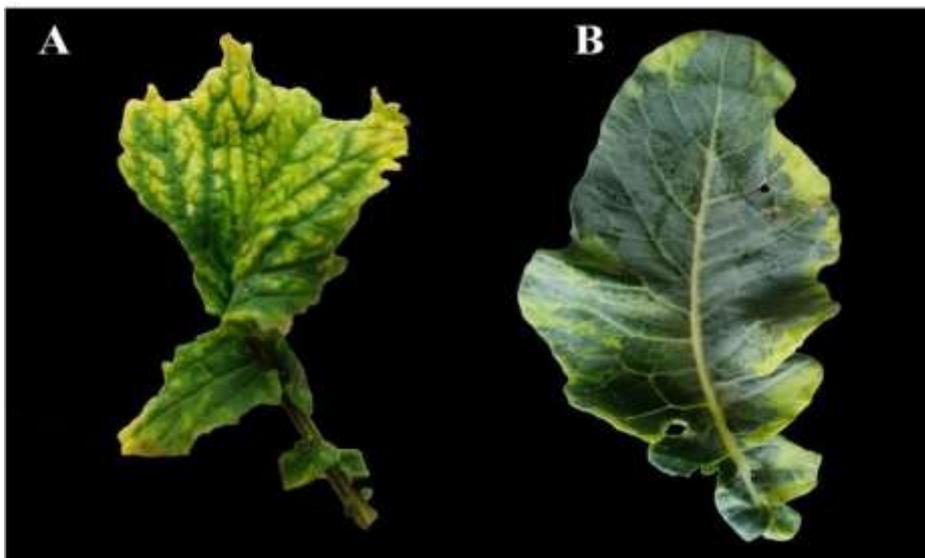


Figura 15: Amostras de brássicas coletadas em campos de produção do município de Ibiúna, SP. (A) Amostra A66: folha de nabiça (*Raphanus raphanistrum*) coinfectada pelo cole mild mosaic virus (CoMMV), turnip mosaic virus (TuMV), *Brassica napus* RNA virus 1 (BnRV1) e turnip yellows virus (TuYV) apresentando mosaico e amarelecimento; (B) Amostra A67: folha de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) infectada pelo CoMMV apresentando clareamento de nervuras, mosaico e amarelecimento.

Foram realizadas análises sorológicas por meio de PTA-ELISA, para detecção de carlavírus nas amostras coletadas. Os resultados obtidos para as amostras de couve-chinesa e couve-de-folha coletadas na cidade de Biritiba Mirim foram positivos para a presença de carlavírus, uma vez que o antissoro policlonal utilizado não discrimina o CoLV do CoMMV. Ao contrário, os resultados obtidos para as amostras coletadas em Ibiúna foram negativos em PTA-ELISA. As mesmas amostras que reagiram como positivas em PTAELISA foram submetidas a RT-PCR, a fim de se verificar a presença (ou não) do CoLV e/ou CoMMV. Após as análises via RT-PCR, verificou-se que as primeiras 46 amostras (A01 a A46) foram positivas para a presença do CoMMV e CoLV, com exceção da amostra A42, que foi positiva apenas para a presença do CoMMV. As amostras A66 e A67 foram submetidas apenas a RT-PCR, sendo os resultados positivos apenas para a presença do CoMMV (Tabela 6, Figuras 16 e 17). Além disso, essa é a primeira vez que o CoMMV é relatado ocorrendo em nabiça (*Raphanus raphanistrum*), brássica da vegetação espontânea que pode ter um papel importante como reservatório desse vírus no campo. Além disso, na amostra A66, foi confirmada a coinfeção entre CoMMV, TuMV, BnRV1 e TuYV, o que evidencia o potencial dessa hospedeira em atuar, nos campos de produção, como reservatório (*reservoir*) de vírus (e também dos afídeos vetores).

Tabela 7: Amostras de brássicas provenientes de diferentes localizações geográficas e a identificação por meio de RT-PCR com iniciadores específicos para a detecção de cole latent virus (CoLV) e cole mild mosaic virus (CoMMV).

Código	Hospedeira Nome científico/(nome popular)	Origem	PTA-ELISA	RT-PCR	
			Carlavirus	CoLV	CoMMV
A01 (1)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A02 (2)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A03 (3)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A04 (4)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A05 (5)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A06 (6)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A07 (7)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A08 (8)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A09 (9)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A10 (10)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A11 (11)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A12 (12)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A13 (13)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A14 (14)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A15 (15)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A16 (16)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	+
A17 (17)	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i> (couve-chinesa)	Biritiba Mirim	+	+	-
A19 (18)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A20 (19)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A39 (20)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A40 (21)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A41 (22)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A42 (23)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	-	+
A43 (24)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A44 (25)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A45 (26)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A46 (27)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Biritiba Mirim	+	+	+
A66 (28)	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Ibiúna	-	-	+
A67 (29)	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Ibiúna	-	-	+
A71 (30)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Chapecó	/	-	+
A72 (31)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	São Roque	/	+	+

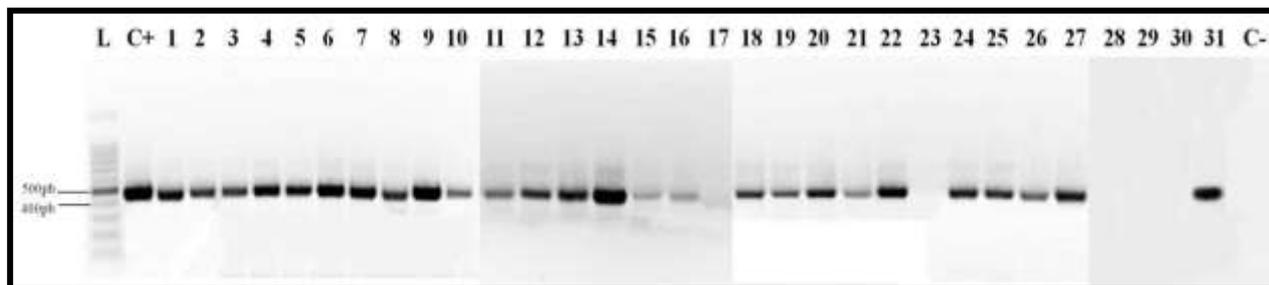


Figura 16: Resultados da detecção do cole latent virus (CoLV) por RT-PCR utilizando iniciadores para a porção genômica correspondente a replicase próxima ao terminal 3' (RdRp - RepC). Eletroforese dos amplicons em gel de agarose 1,2% para detecção de CoLV- fragmento de 486 pb. Linhas 1-31: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 7. C +: folhas de couve infectadas. C-: couve-de-folha sadia. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 100 pb, Promega, EUA).

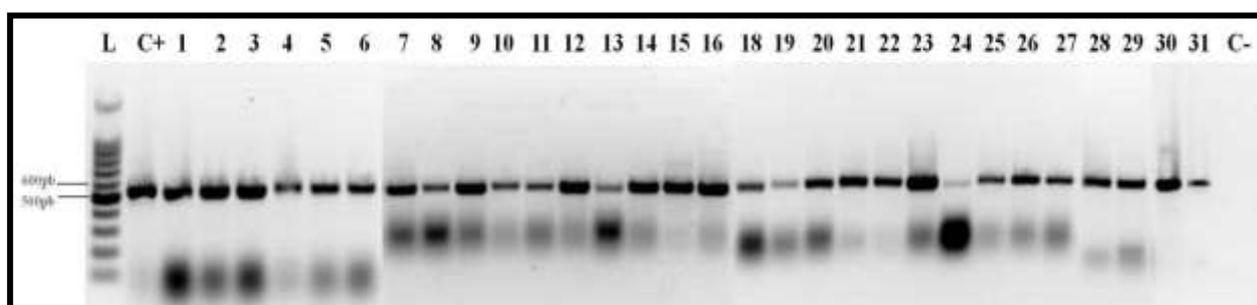


Figura 17: Resultados da detecção do cole mild mosaic virus (CoMMV) por RT-PCR utilizando iniciadores para a porção genômica correspondente a replicase próxima ao terminal 3' (RdRp - RepC). Eletroforese dos amplicons em gel de agarose 1,2% para detecção de CoMMV- fragmento de 532 pb. Linhas 1-31: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 7. C +: folhas de couve infectadas. C-: couve-de-folha sadia. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 100 pb, Promega, EUA).

Para a maioria das amostras coletadas, os resultados obtidos foram negativos tanto para presença do BnRV1, quanto para o TuYV. No total, o TuYV foi detectado em doze amostras (cinco nabiças - *Raphanus raphanistrum*, quatro plantas de repolho - *B. oleracea* var. *capitata*, duas couves - *B. oleracea*, e uma planta de brócolis - *B. oleracea* var. *italica*), enquanto o BnRV1 foi detectado em seis amostras (quatro nabiças, uma planta de repolho e uma couve). Em três dessas amostras (duas nabiças e um repolho) o BnRV1 e o TuYV foram identificados em coinfeção. As amostras com coinfeções apresentavam sintomas de clareamento de nervuras (A34 - repolho, coinfeção entre BnRV1, TuMV e TuYV), mosaico e faixa das nervuras (A59 - nabiça, com coinfeção entre BnRV1 e TuMV) e mosaico e amarelecimento (A62 - nabiça, com coinfeção entre BnRV1 e TuYV; A67 - brócolis, com coinfeção entre CoMMV e TuYV). Na amostra A68 foi detectada a presença do BnRV1 e TuYV (folhas de couve); A69 foi detectado apenas o TuMV (folhas de nabo - *B. rapa* subsp. *rapa*); A70 foi detectada a coinfeção entre BnRV1, TuMV e TuYV (folhas de nabiça); A71

foi detectada a coinfeção entre o CoMMV e TuYV (folhas de couve); A72 identificou-se a coinfeção entre o CoLV e o CoMMV (folhas de couve) (Tabela 8, Figuras 18 e 19). Na amostra A72, apesar de não ter sido detectado pela PCR, as análises de viroma realizadas a partir do sequenciamento completo, indicaram a presença de fragmentos deo BnRV1 e do TuYV, além da presença de cytorhabdovirus (cabbage cytorhabdovirus 1 – CCyV-1). Identificou-se também coinfeção entre CoMMV, BnRV1, TuYV e TuMV em uma amostra de nabiça (A66) com sintomas de mosaico e amarelecimento (Figura 20).

Tabela 8: Amostras de brássicas coletadas nos municípios de Biritiba Mirim e Ibiúna (cinturão-verde) de São Paulo, e a identificação por meio de RT-PCR com *primers* específicos para o *Brassica napus* RNA virus 1 (BnRV1) e turnip yellows virus (TuYV).

Código	Hospedeira Nome científico/ (nome popular)	Local de coleta	RT-PCR	
			BnRV1	TuYV
A24 (1)	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Ibiúna	-	+
A30 (2)	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Ibiúna	-	+
A34 (3)	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Biritiba Mirim	+	+
A35 (4)	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Ibiúna	-	+
A37 (5)	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Ibiúna	-	+
A58 (6)	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (repolho)	Biritiba Mirim	-	+
A59 (7)	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim	+	-
A62 (8)	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Biritiba Mirim	+	+
A66 (9)	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Ibiúna	+	+
A67 (10)	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócolis)	Ibiúna	-	+
A68 (11)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Itabúna	+	+
A69 (12)	<i>B. rapa</i> subsp. <i>rapa</i> (nabo)	Rio Grande do Sul	-	-
A70 (13)	<i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça)	Paraná	+	+
A71 (14)	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve)	Chapecó	-	+

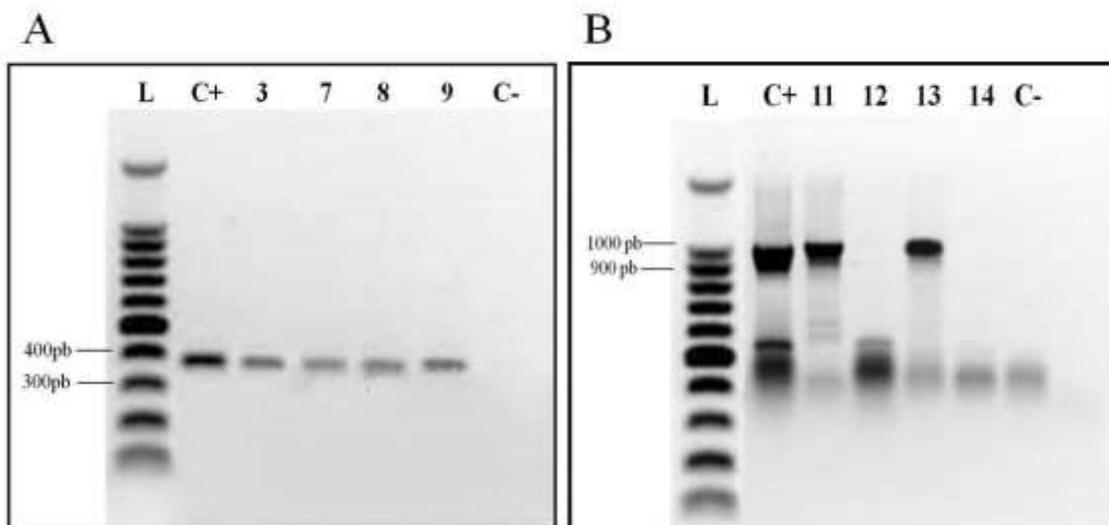


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos amplicons para detecção do BnRV1 por RT-PCR utilizando *primers* para a porção genômica correspondente a (A) capa proteica (CP), fragmento de 380 pb; (B) Propol (Pro-proteinase, Pol-RNA polimerase dependente de RNA – RdRp), fragmento de 988 pb. Linhas 3, 7, 8 e 9, 11 e 13 amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 8. C +: folhas de couve infectadas. C -: couve-de-folha sadia. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 100 pb, Promega, EUA).

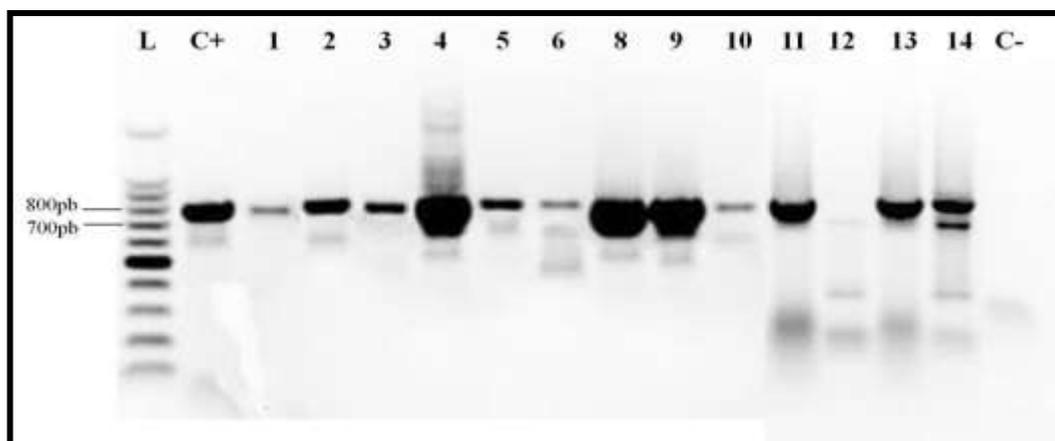


Figura 19: Resultados da detecção do TuYV por RT-PCR utilizando *primers* para a porção genômica correspondente a replicase (ORF3). Eletroforese dos amplicons em gel de agarose 1,2% para detecção de TuYV- fragmento de ~750 pb. Linhas 1-14: amostras de acordo com os códigos que constam da Tabela 8. C +: folhas de couve infectadas. C -: couve-de-folha sadia. L: Marcador de peso molecular (DNA escada de 100 pb, Promega, EUA).



Figura 20: (1) Vista geral de uma área de produção comercial de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) no município de Ibiúna, SP. Observa-se uma única planta exibindo sintoma de avermelhamento foliar. (2) Detalhe de uma planta de repolho infectada por um isolado brasileiro do turnip yellows virus (TuYV) com sintoma de avermelhamento das folhas baixas. (3) Área próxima do cultivo de repolho com elevada infestação de plantas de nabiça (*Raphanus raphanistrum*). (4) Detalhe de uma planta de nabiça com mosaico amarelo, sintoma característico induzido pelo TuYV.

5.3. Testes biológicos: BnRV1 e TuYV

O isolado de brassica napus RNA virus 1 (BnRV1) foi inoculado em 15 plantas da espécie *Raphanus raphanistrum* (nabiça). Após 15 dias da inoculação não houve manifestação de sintomas. Após 30 dias, foram coletadas amostras foliares de cada planta inoculada e submetidas a RT-PCR. A RT-PCR foi realizada utilizando *primers* específicos para a porção genômica da Propol do BnRV1. Os resultados foram negativos para a presença do vírus nas 15 plantas inoculadas.

O isolado de turnip yellows vírus (TuYV) coletado de repolho ‘Esmeralda 235’, no município de Araucária em maio de 2017, foi utilizado para a realização de testes biológicos. Foram inoculadas 5 plantas de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), couve-chinesa (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*), couve-de-folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*) e mostarda (*Brassica juncea*). Além disso, também foram inoculadas diferentes plantas hospedeiras como *Nicotiana benthamina* (6 plantas), *Nicotiana glutinosa* (6 plantas),

Physalis floridana (6 plantas) e *Chenopodium quinoa* (3 plantas). Os resultados foram negativos para a presença do TuYV em todas as plantas mecanicamente inoculadas.

5.4. Avaliação dos testes de hibridização *dot-blot* para detecção da presença do BnRV1 nas amostras coletadas

Para a avaliação dos testes de hibridização *dot-blot* na detecção de isolados de BnRV1 foram avaliadas seis amostras (duas amostras de couve-de-folha - *B. oleracea* var. *acephala*; quatro amostras de nabiça - *Raphanus raphanistrum*) que haviam sido previamente confirmadas como infectadas pelo BnRV1 quando avaliadas via RT-PCR. Os RNAs dessas amostras foram previamente diluídos e quantificados. Após a revelação da membrana onde as amostras foram aplicadas, somente uma amostra foi considerada positiva.

5.5. Avaliação do efeito da temperatura na expressão de sintomas do CoMMV_T25

A partir dos dados obtidos foi observado que houve diferenças estatísticas em ambos os experimentos realizados (Experimento 1: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 20°C; Experimento 2: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C), porém as plantas não expressaram sintomas perceptíveis. No experimento 1 foi observada diferença estatística nos parâmetros altura, área foliar e peso seco. Quanto ao parâmetro número de folhas, não foi observada diferença entre os tratamentos (Figura 21). A partir da 2ª coleta (15 dias após as inoculações), houve uma redução significativa da altura das plantas de *Brassica oleracea* e *Brassica rapa* inoculadas em comparação com as plantas testemunhas, que apresentaram uma altura média maior. No entanto, foi observado que na 5ª coleta (28 dias após as inoculações) não houve diferença estatística (Figura 22). Nas análises estatísticas realizadas para o parâmetro área foliar, observou-se que as plantas inoculadas tinham uma área foliar maior quando comparadas com as testemunhas, entre as coletas 2 e 4 (entre 15 e 21 dias após as inoculações) (Figura 23). Com relação ao peso seco das plantas, observou-se que as plantas inoculadas de *B. oleracea* apresentaram um valor de peso seco maior do que as plantas testemunhas da mesma variedade.

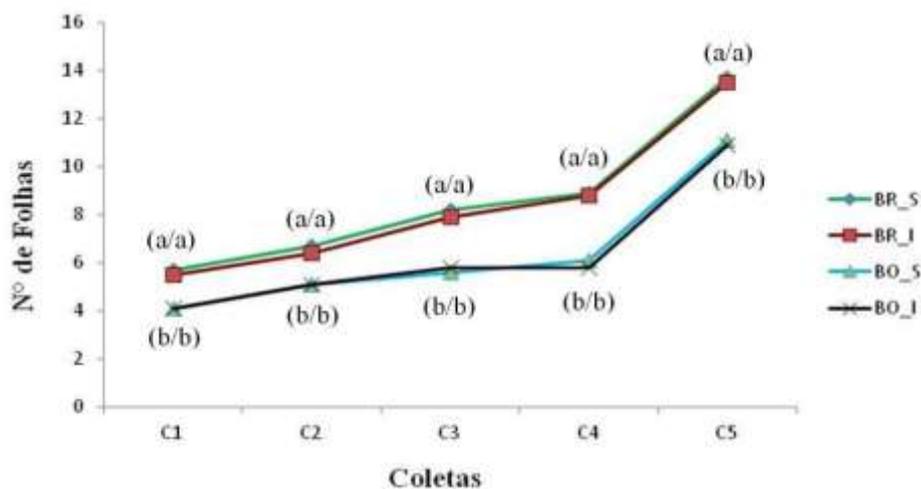


Figura 21: Efeito da temperatura (Experimento 1: 12 h de escuro a 15 °C e 12 h de luz a 20°C) no número de folhas de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25). (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.

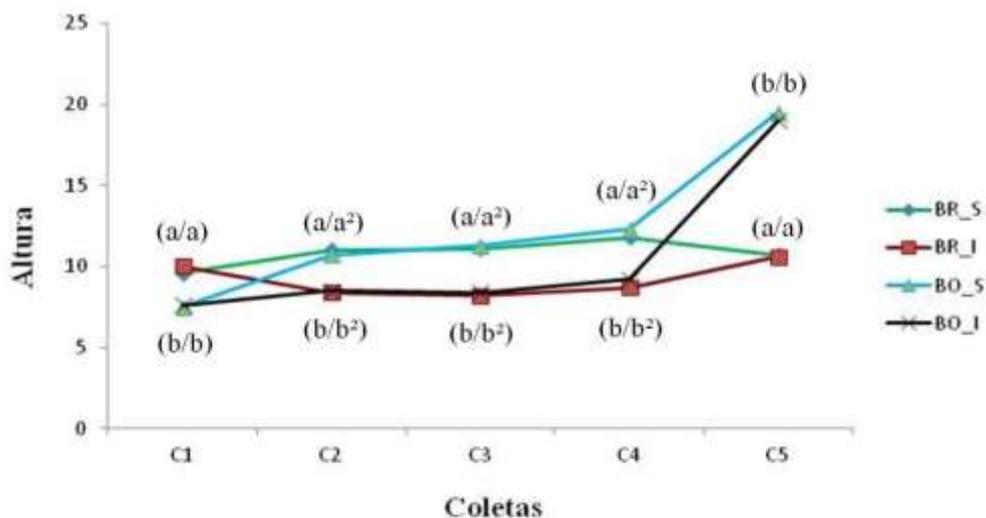


Figura 22: Efeito da temperatura (Experimento 1: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 20°C) na altura de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25). (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.

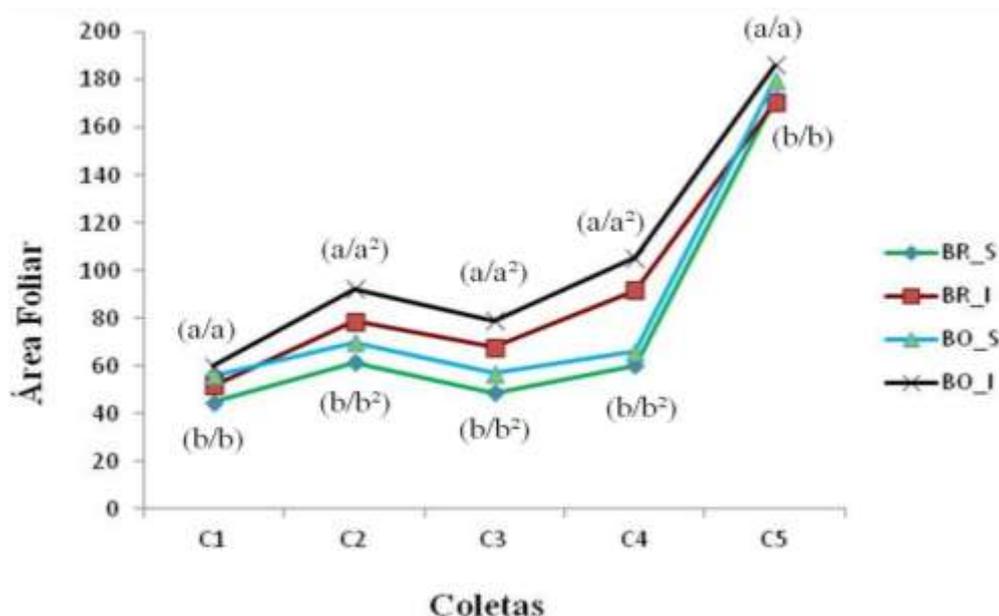


Figura 23: Efeito da temperatura (Experimento 1: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 20°C) na área foliar de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25); (a) corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.

No experimento 2 os resultados indicaram que as plantas de *B. rapa* e *B. oleracea* usadas como testemunhas obtiveram média estatística maior do que a plantas inoculadas com o isolado de CoMMV_T25, quando analisados os parâmetros de número de folhas, altura, área foliar. Com relação aos dados de número de folhas foi possível observar que a diferença estatística iniciou a partir da 2ª coleta apenas nas plantas da variedade *B. rapa* e nas coletas 4 e 5 para ambas as variedades avaliadas (Figura 24). No parâmetro altura os dados indicaram que a diferença estatística ocorreu a partir da 2ª coleta em ambas as variedades até a 4ª coleta, sendo que na 5ª a diferença observada ocorreu apenas nas plantas da variedade *B. rapa* (Figura 25). Nas análises dos dados da área foliar foi observado que na coleta 2 a diferença estatística ocorreu apenas na variedade *B. rapa* e apenas na 5ª coleta foi observada diferença em ambas a variedades (Figura 26). Quando analisado os resultados obtidos do Peso Fresco, houve diferença estatística nas plantas de *B. rapa*, onde as plantas testemunhas obtiveram números maiores de peso seco com relação às plantas inoculadas.

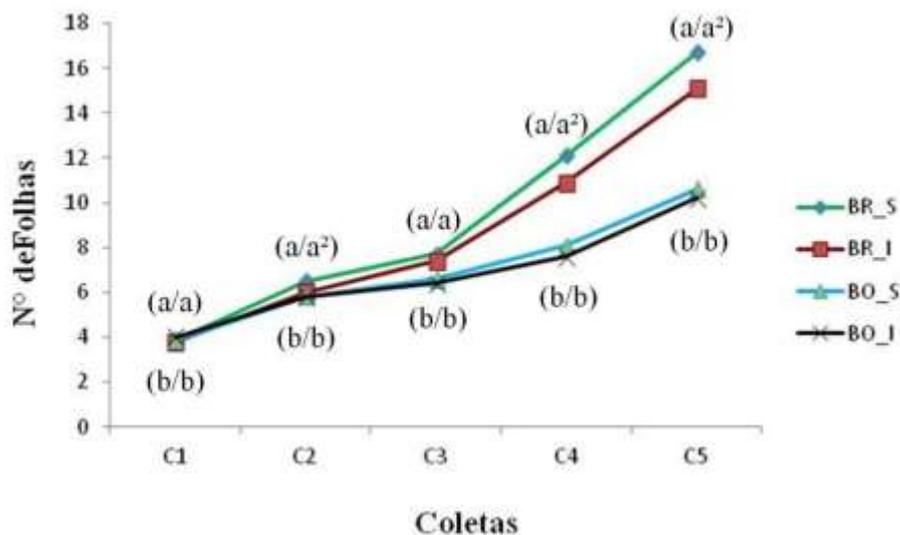


Figura 24: Efeito da temperatura (Experimento 2: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C) no número de folhas de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25); (a) corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.

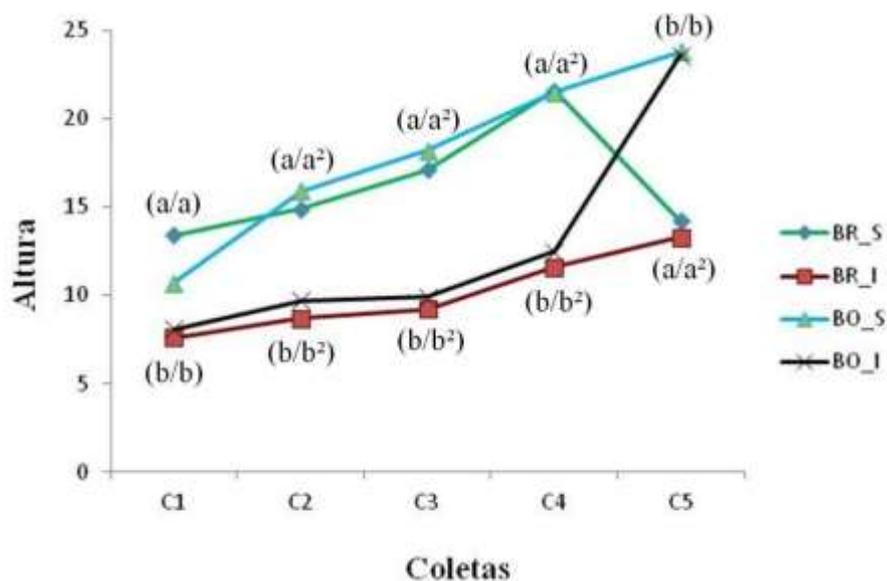


Figura 25: Efeito da temperatura (Experimento 2: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C) na altura de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25). (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b) Sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²) Houve diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.

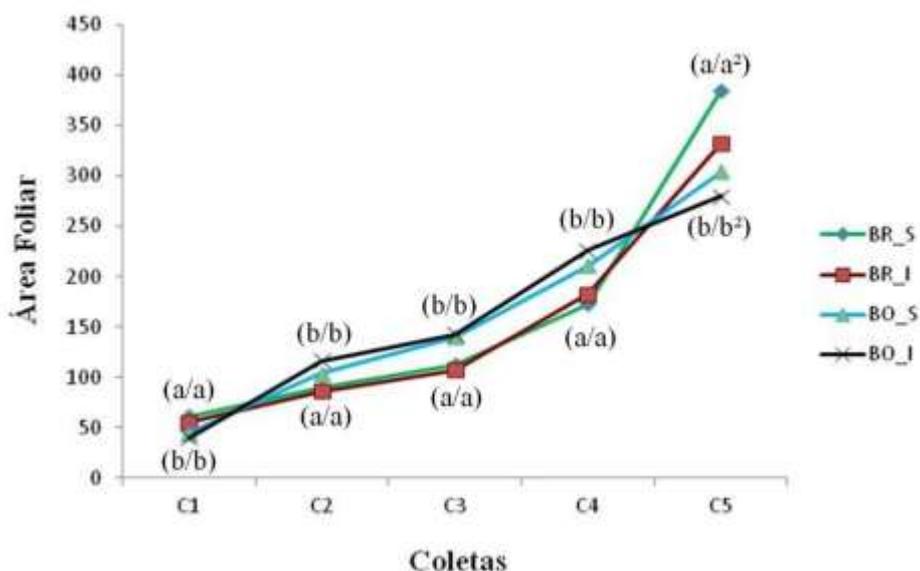


Figura 26: Efeito da temperatura (Experimento 2: 12 h de escuro a 15°C e 12 h de luz a 30°C) na área foliar de plantas de *Brassica rapa* e *B. oleracea* infectadas (I) e não infectadas (S) por um isolado do cole mild mosaic virus (CoMMV_T25). (a) Corresponde à variedade *Brassica rapa* (Verde = BR_S; Vermelho = BR_I); (b) Corresponde à variedade *Brassica oleracea* (Azul = BO_S; Preto = BO_I). (a/a) e (b/b): sem diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas; (a/a²) e (b/b²): com diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas.

6. DISCUSSÃO

A metavirômica tem revolucionado as pesquisas voltadas para os vírus, promovendo o desenvolvimento de tecnologias que facilitam as análises, favorecendo a redução dos custos para a realização do sequenciamento completo e análises das bibliotecas, tornando-as cada vez mais acessíveis e proporcionando o aumento do conhecimento e descoberta de vírus pertencentes a espécies novas (Villamor et al. 2019; Mehetre et al. 2021). Diferentes estudos e metodologias são realizados por meio do sequenciamento completo de alto rendimento (HTS) ampliando, assim, o conhecimento referente às interações vírus-hospedeiro-vetor, os efeitos das coinfeções virais, a importância das plantas da vegetação espontânea como reservatório (*reservoir*) de vírus no campo, as relações epidemiológicas, e os efeitos que as mutações e recombinações podem causar no surgimento de novas doenças (Pagán & García-Arenal, 2018; Villamor et al. 2019; Mehetre et al. 2021). Além disso, a metavirômica permite, em função do conhecimento das populações virais, o desenvolvimento de técnicas mais eficientes de prevenção e controle de doenças virais, auxiliando no estabelecimento de estratégias de manejo e controle para se reduzir os danos e as consequentes perdas econômicas.

Embora as brássicas tenham relevância para o Agro brasileiro, ainda há pouco conhecimento sobre a diversidade de vírus que infectam essas hortaliças no Brasil. Portanto, neste trabalho, foram realizadas análises de viroma para explorar a diversidade de vírus em cultivos de brássicas no Brasil. Seis amostras de couve-de-folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*) infectadas, provenientes do Distrito Federal (DF), Goiás (GO), Paraná (PR) e São Paulo (SP), foram submetidas a extrações de RNA total, que foram encaminhados para sequenciamento de alto rendimento (HTS). As análises de bioinformática das bibliotecas obtidas confirmaram a presença de genomas completos de dois carlavírus, um polerovírus, um waikavírus, além da presença de fragmentos de caulimovírus, potyvírus e cytorhabdovírus. Na amostra do DF, foram identificadas sequências correspondentes ao turnip mosaic virus (TuMV), cole mild mosaic virus (CoMMV) e cole latent virus (CoLV). Sequências genômicas completas do CoMMV, e do CoLV foram obtidas da amostra proveniente do PR. Além disso, também foram detectados fragmentos de sequências de cauliflower mosaic virus (CaMV). A partir das análises de bioinformática da amostra de couve de Goiás, foram obtidas sequências do CoMMV e do CoLV. Em duas das amostras do Estado de São Paulo, foram detectadas a presença do TuMV e do brassica napus RNA virus 1 (BnRV1), e na terceira amostra foram detectadas sequências do CoLV, CoMMV,

BnRV1 e do turnip yellows virus (TuYV), além da presença da sequência completa de um cytorhabdovírus.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com estudos realizados por Rivarez et al., (2023), no qual demonstraram que mesmo em agroecossistemas muito estudados, como o em cultivos intensivos e sucessivos de tomate, o perfil do viroma pode ser variável e até desconhecido, dependendo das condições climáticas, da abundância e diversidade de artrópodes vetores, da composição florística de espécies da vegetação espontânea, e das plantas silvestres e cultivadas que dividem espaço com a cultura alvo do estudo.

Portanto, a identificação da presença dos vírus relatados neste estudo contribuiu para a ampliação do conhecimento de viromas em brássicas, além de evidenciar a ocorrência de infecções e coinfeções de espécies de vírus pertencentes ou não à mesma família nos campos de produção. Além disso, permitiram avanços do conhecimento da distribuição geográfica desses vírus, e a descoberta de novas espécies virais até então não relatadas nos campos de produção de brássicas no Brasil.

Desde 1970, quando foi descrito pela primeira vez em couve-de-folha no Estado de São Paulo (Kitajima et al. 1970), o cole latent virus (CoLV) permanecia como o único carlavírus conhecido que infectava brássicas (couve-de-folha, couve-flor e raiz-forte), com relatos restritos ao Brasil (Kitajima et al. 1970; Mello et al. 1987; Belintani et al. 2002; Eiras et al. 2008; Kitajima 2020). Além disso, o CoLV estava classificado como pertencente à espécie *Cole latent virus*, gênero *Carlavirus*, mesmo tendo uma sequência de somente 1.040 nucleotídeos, referente ao terminal 3' do genoma, depositado no GenBank (NCBI RefSeq: NC_038322).

Com base em coletas de brássicas realizadas em campos de produção de hortaliças, de 2006 a 2021, em diversas regiões do Brasil, utilizando análises biológicas, sorológicas e moleculares, incluindo sequenciamento de alta performance, foi possível avançar no conhecimento sobre os carlavírus que infectam brássicas, que incluiu o sequenciamento completo do genoma de um isolado de CoLV (T90), confirmando seu status taxonômico. Além disso, caracterizou-se também um vírus que poderia pertencer a uma espécie nova de carlavírus (T25). Os genomas dos isolados T25 e T90 são constituídos por um RNA linear de fita simples, senso positivo, com cauda poliadenilada [poly(A)] no terminal 3', e seis ORFs, que respaldam a natureza, estrutura e organização genômica típica dos carlavírus (Adams et al. 2012). No entanto, apesar das semelhanças biológicas, estruturais e genômicas, dadas as diferenças nas sequências de nucleotídeos, e de acordo com os critérios taxonômicos

para demarcação de espécies no gênero *Carlavirus*, os isolados T25 e T90 são espécies distintas. Portanto, foi proposta uma nova espécie dentro do gênero *Carlavirus* para abrigar o isolado T25, denominada cole mild mosaic vírus (CoMMV).

Inicialmente, ao se comparar a ORF5 (CP) dos isolados CoMMV_T25 e CoLV_T90 com a do isolado de CoLV, descrito em 2002 (NC_038322) (Belintani et al. 2002), os valores de porcentagem de identidade nt e aa foram superiores a 78,0% e 97,6%, respectivamente. Com base nessas comparações de porcentagem de identidade, os três isolados poderiam ser considerados vírus da mesma espécie, ou seja, isolados do CoLV. No entanto, de acordo com os critérios atuais para a demarcação de espécies do gênero *Carlavirus* adotados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), espécies distintas devem ter menos de 72% de identidade de nucleotídeos (ou 80% de identidade aminoácidos) quando comparados os genes da CP (ORF5) ou da replicase (ORF1) (Adams et al. 2012; ICTV 2022). Assim, a proposição para acomodar uma nova espécie no gênero *Carlavirus* pode ser baseada nos valores de porcentagem de identidade mais baixos da ORF1. E de fato, quando a ORF1 foi analisada, os valores de identidade entre CoMMV_T25 e CoLV_T90 (nts: 66,7%, aa: 71,1%) permaneceram abaixo do limite padrão, o que leva ao reconhecimento de CoMMV_T25 e CoLV_T90 como sendo membros de duas espécies distintas, *Cole latent virus* e a espécie tentativa *Cole mild mosaic virus*, respectivamente (Oliveira et. al., 2022).

Outras evidências forneceram suporte adicional às designações de T90 como um isolado de CoLV e T25 como sendo uma espécie nova. Enquanto os critérios de demarcação de espécies do gênero *Carlavirus* levam em conta os valores de identidade da ORF1 ou ORF5, a ORF1 dos carlavírus é seis vezes maior que a ORF5, representando quase 70% do genoma viral. A ORF1, ao contrário da ORF5, pode representar mais extensivamente a história evolutiva dos carlavírus. Isto é particularmente relevante no caso de CoMMV_T25 e CoLV_T90, cujos valores de identidade da ORF1, mas não os da ORF5, atendem aos requisitos estabelecidos pelos critérios de demarcação de espécies. A porcentagem de identidade da ORF 6 não é considerada pelas regras de demarcação de espécies, porém o isolado CoLV_T90 quando comparado com o isolado de CoLV descrito em 2002 (Belintani et al. 2002) está mais intimamente relacionado do que a sequência cognata de CoMMV_T25. Os valores de porcentagem de identidade entre a ORF6 do CoLV caracterizado em 2002 e o CoLV_T90 superam 90% (tanto nos níveis nt quanto aa), enquanto entre CoMMV_T25 e CoLV_T90, os valores permaneceram abaixo de 80%.

Outro ponto importante está na distância genética de amplicons, que correspondem a dois segmentos genômicos obtidos de mais de cinco isolados virais de cada espécie, e que indicam uma faixa menor de divergência de sequências entre vírus da mesma espécie do que entre vírus das duas espécies estudadas. No entanto, apesar de considerar CoLV_T90 como um isolado do CoLV, essa atribuição poderia ser alterada caso novos isolados, mais intimamente relacionados ao isolado descrito em 2002 (Belintani et al. 2002), sejam identificados. Seria o caso, por exemplo, se um isolado putativo apresentar uma porcentagem de identidade de nucleotídeos mais alta na ORF5 quando comparado com a do CoLV descrito em 2002, mas com valores de identidade da ORF1, quando comparados com o isolado T90, menores que o limiar para a demarcação de espécies no gênero *Carlavirus*. Os genomas completos de CoMMV e CoLV possuem os maiores valores de porcentagem de identidade de nt entre si (68,0%). Em seguida, os maiores valores de identidade, nessas comparações, correspondem a diferentes carlavírus: narcissus common latent virus (NCLV, AM158439) no caso de CoMMV (62,4%) e potato virus M (PVM, D14449) para CoLV (63,3%).

De acordo com a reconstrução filogenética, baseada em sequências de aminoácidos da replicase e da capa proteica, a relação mais próxima permaneceu entre o CoMMV e o CoLV em um subclado incluindo também PVM e NCLV. Uma das características da maioria dos vírus pertencentes ao gênero *Carlavirus* é a indução de sintomas leves ou mesmo ausência da indução de sintomas (latência), sem causar danos em suas plantas hospedeiras, mesmo em infecções sistêmicas (Foster 1992). Devido ao fato do CoLV, frequentemente, não induzir sintomas e danos em suas hospedeiras e não haver relatos de perdas de produção, poucos estudos foram realizados, até o momento, com relação aos aspectos epidemiológicos, e tampouco sobre a influência de sua variabilidade genética na produção de brássicas. Além disso, pouco se sabia sobre a gama de hospedeiras do CoLV, sendo considerado como restrito ou quase restrito a espécies do gênero *Brassica* (Belintani et al. 2002). Experimentalmente, o CoLV já havia sido relatado infectando berinjela (*Solanum melongena*), *Chenopodium quinoa*, *C. giganteum* (ex *C. amaranticolor*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), *Malva parviflora*, melancia (*Citrullus lanatus*), mostarda (*B. rapa*), nabo (*B. rapa* subsp. *rapa*), perpétua (*Gomphrena globosa*), rabanete (*Raphanus sativus*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*) e soja (*Glycine max*). No campo, o CoLV, até então, havia sido relatado em plantações comerciais infectando couve-de-folha, couve-flor e raiz-forte (Kitajima et al. 1970; Costa et al. 1972, 1974; Mello et al. 1987; Belintani et al. 2002; Eiras et al. 2008).

Por meio da inoculação mecânica dos isolados CoMMV_T25 e CoLV_T90 em diferentes variedades comerciais de brássicas e avaliação de uma gama de hospedeiros experimentais constituídos por diferentes espécies de Brassicaceae e Solanaceae, observou-se o desenvolvimento de sintomas de mosaico em plantas de couve-flor e couve-rábano (*B. oleracea* var. *botrytis* e *B. oleracea* var. *gongylodes*, respectivamente), sintomas locais em plantas de *Chenopodium giganteum*, couve-chinesa (*B. rapa* ssp. *pekynensis*), e mosaico, deformação foliar e atraso no crescimento em plantas de *Nicotiana megalosiphon* (Solanaceae) (Oliveira et al., 2021). Em geral, o conjunto de plantas suscetíveis ao CoMMV_T25 combina com a gama de hospedeiros de CoLV_T90. Além disso, devido ao fato de *N. megalosiphon* desenvolver sintomas sistêmicos, plantas dessa espécie de solanácea podem ser utilizadas como hospedeiras experimentais para a detecção de CoLV e CoMMV, sendo útil também para separar infecções mistas entre os carlavírus de brássicas (CoMMV e CoLV) (Oliveira 2019). Estas informações corroboram com os resultados obtidos a partir das amostras coletadas neste trabalho, em áreas de cultivo de brássicas no cinturão verde da cidade de São Paulo. A partir de análises moleculares, observou-se a ocorrência de CoMMV e CoLV, em sua grande maioria, apenas em amostras de couve-de-folha e couve-chinesa, sem a indução de sintomas. No entanto, o CoMMV foi identificado em brócolis com sintomas de amarelecimento foliar, e em nabiça, apresentando mosaico e amarelecimento. Esses resultados sugerem que o CoMMV parece possuir uma maior capacidade, em comparação ao CoLV, para infectar diferentes espécies e variedades de brássicas cultivadas e da vegetação espontânea. O CoLV, até o momento, não foi isolado de espécies da vegetação espontânea, e tampouco foi capaz de infectar nabiça por meio de inoculações mecânicas experimentais. Com relação às plantas de brócolis e de nabiça infectadas pelo CoMMV, apesar de este ser o primeiro relato de CoMMV ocorrendo em plantas de brócolis, ainda não é possível afirmar que os sintomas observados foram induzidos pelo CoMMV, pois ambas as plantas estavam coinfectadas com o CoMMV e o BnRV1 na amostra de brócolis, e com o CoMMV, TuMV, BnRV1 e TuYV na amostra de nabiça.

Além dos carlavírus, neste trabalho, foram identificados e caracterizados, em cultivos comerciais de brássicas, dois vírus que ainda não haviam sido relatados no Brasil: BnRV1 (*Waikavirus*) obtido de plantas de couve-chinesa oriundas do município de Bragança Paulista, SP; e isolados do TuYV (*Polerovirus*), obtidos de plantas de repolho coletadas nos municípios de Araucária, PR, e Ibiúna, SP. O BnRV1 foi descrito pela primeira vez, recentemente, por pesquisadores coreanos, infectando plantas de canola (ou colza) (*Brassica*

napus) (Park & Hahn 2019). Esses autores, inclusive, depositaram a primeira e, até então, única sequência do genoma desse vírus no Genbank (NC_040586.1) em setembro de 2019.

No presente trabalho, a partir do sequenciamento em larga escala (NGS) utilizando RNAs totais extraídos de plantas de couve-chinesa, foi possível obter o genoma completo do BnRV1. Este, além de ser o primeiro relato da ocorrência do BnRV1 no Brasil, parece ser o segundo relato da ocorrência desse vírus no mundo.

Observou-se também coinfeção de quatro vírus simultaneamente (CoMMV, BnRV1, TuYV e TuMV) em uma amostra de nabiça (*Raphanus raphanistrum*) com sintomas de mosaico e amarelecimento, coletada em Ibiúna, SP. Esses resultados corroboram com dados obtidos por outros pesquisadores que observaram que as coinfeções (entre dois ou mais vírus) ocorrem comumente na natureza (Rodrigues et al. 2019). Essas interações podem ser sinérgicas ou antagônicas e podem influenciar na expressão de sintomas, transmissão, replicação viral, efeitos citopatológicos, movimento célula a célula e no tropismo celular (Jo et al. 2017; Moreno & López-Moya 2020). Além disso, a nabiça é uma planta da vegetação espontânea que pode atuar como reservatório natural dos vírus que infectam brássicas (Rodrigues et al. 2019), facilitando a manutenção desses vírus nos campos de produção e a sua propagação, uma vez que esses vírus são transmitidos por afídeos e a nabiça pode atuar também como hospedeira de algumas espécies desses insetos que atuam como vetores.

O emprego de inseticidas para o controle dos afídeos vetores não é recomendado para os vírus transmitidos de modo não circulativo como o CaMV, CoLV, CoMMV e o TuMV, uma vez que a transmissão desses vírus é feita por picadas de prova, logo após a aquisição ou transmissão, antes que o inseticida tenha algum efeito sobre o afídeo (Hull 2014). Nas épocas em que as populações de afídeos aumentam significativamente, principalmente quando as temperaturas e os níveis de precipitação diminuem (como ocorre durante o inverno na Região Sudeste do Brasil), o controle químico preventivo pode ser uma prática recomendada a fim de reduzir as populações desses insetos (Tomlinson 1987; Pasqual et al. 2010; Hull 2014). Ao contrário dos vírus transmitidos de modo não circulativo, para o TuYV, que é transmitido de modo circulativo (persistente, não propagativo), o controle químico dos afídeos vetores pode ser recomendado. Essa medida de controle é utilizada em diversos países de clima temperado (Newbert 2016). O uso de piretroides, em países da Europa, tem tido uma elevada eficiência no controle da dispersão do TuYV por afídeos em áreas cultivadas. Para evitar danos significativos, outras medidas de controle podem ser recomendadas: (i) controle das plantas espontâneas, que atuam como reservatórios dos

afídeos e do vírus – no caso das brássicas, as nabiças parecem desempenhar esse papel; (ii) eliminação sistemática de plantas infectadas (sintomáticas ou não), que atuam como fontes de inóculo; (iii) rotação de variedades e de culturas – procurar alternar cultivos de brássicas com espécies de outras famílias botânicas que não sejam hospedeiras do(s) vírus; e (iv) monitoramento das populações de afídeos, a fim de se evitar que atinjam níveis muito elevados – nesses casos, a disseminação dos vírus pode ser muito eficiente (Eiras et al. 2018; 2020; Fingu-Mabola & Francis 2021).

O relato da ocorrência do TuYV no Brasil acendeu um alerta, uma vez que, atualmente, esse vírus pode ser considerado um dos patógenos que causa danos e perdas econômicas nos cultivos de brássicas na Europa, Ásia e Oceania (Newbert 2016; Walsh et al. 2011). O TuYV, em cultivos de canola, em alguns países da Europa, tem causado perdas de mais de 46% (Newbert 2016). Em brócolis, couve-flor e repolho, as perdas ultrapassam os 60%. Em repolho, além dos sintomas foliares, o TuYV pode causar reduções de até 20% do peso médio da cabeça. No Brasil, devido à sua detecção recente, ainda não se conhece o comportamento do TuYV nos campos de produção de brássicas. Porém, há uma preocupação em função do seu potencial em causar danos e consequentes perdas econômicas (Walsh et al. 2011). Além disso, como os sistemas de cultivo de brássicas, nas principais áreas produtoras do Brasil, são baseados em monoculturas intensivas, associadas à presença de constante de espécies de afídeos relatadas como vetores do TuYV, os riscos potenciais de danos causados por esse vírus, e consequentes perdas devem ser considerados. Pouco se sabe também sobre o potencial do BnRV1 em causar danos e perdas econômicas nos cultivos de brássicas, uma vez que, trata-se de um vírus descrito recentemente ocorrendo apenas em dois países.

Os resultados deste trabalho confirmam que há uma diversidade de vírus nos campos de produção de brássicas no cinturão verde da cidade de São Paulo, incluindo pelo menos dois vírus que ainda não haviam sido relatados no Brasil. O monitoramento das populações desses vírus nos campos de produção de hortaliças, principalmente brássicas, passa a ser essencial, e uma especial atenção deverá ser dada ao TuYV, que pode infectar nabiça, é transmitido por afídeos, e é considerado em outros países um vírus emergente (Newbert 2016). Além da contribuição para uma classificação taxonômica robusta do CoLV, por meio da caracterização do genoma completo do isolado T90, a identificação e caracterização do CoMMV também contribuirá para ampliar o viroma conhecido das brássicas e fornecer evidências da distribuição dos carlavírus que infectam brássicas em áreas de cultivos dessas hortaliças no Brasil. Os novos *primers* desenvolvidos neste trabalho, e as informações

genômicas geradas durante a caracterização dos carlavírus de brássicas poderão ser úteis para abordar características relevantes da epidemiologia desses patógenos, e também para avaliar as interações em infecções mistas entre os carlavírus, potyvírus e caulimovírus que comumente afetam os cultivos de brássicas no Brasil.

As doenças causadas por vírus possuem grande destaque nos sistemas agrícolas mundiais, sendo uma ameaça constante para a humanidade, principalmente quando se tratam de vírus emergentes. Os danos causados por vírus em brássicas podem levar à desvalorização do produto final, devido os sintomas que podem se manifestar nas folhas, nas inflorescências, na formação da “cabeça” e nas raízes, dificultando ou inviabilizando a comercialização. Alguns fatores abióticos como a temperatura podem influenciar nas interações vírus-hospedeiro, modulando a expressão de sintomas, e podendo afetar a resistência da planta. Considerando o pouco conhecimento disponível sobre os efeitos da temperatura na expressão de sintomas de vírus que infectam brássicas, principalmente os carlavírus, foi feita a avaliação do efeito da temperatura na infecção pelo CoMMV. A partir dos experimentos realizados, observou-se que, embora não tenha havido expressão de sintomas, houve diferenças estatísticas para alguns dos parâmetros avaliados.

As análises realizadas a partir das avaliações do efeito da temperatura na infecção do CoMMV em duas espécies de brássicas confirmaram que o ambiente pode interferir no desenvolvimento das plantas infectadas por esse vírus. No experimento 1, com 12 horas de luz a 20°C e 12 horas de escuro a 15°C, 15 dias após as inoculações, observaram-se reduções significativas em comparação com as plantas testemunhas. Nas plantas de *Brassica oleracea* e *B. rapa* inoculadas, a área foliar e o valor de massa seca foi maior nas plantas inoculadas quando comparados com as plantas testemunhas. No experimento 2, com 12 horas de luz a um regime de temperatura mais elevado (30°C), as plantas testemunhas (não inoculadas) apresentaram média estatística maior do que as plantas inoculadas para os seguintes parâmetros: número de folhas, altura das plantas, área foliar. Resultados similares foram obtidos por Singh et al. (2018), que ao inocularem plantas de feijão com o *Groundnut bud necrosis tospovirus* (GBNV), observaram que quando as plantas foram incubadas a 25 e 30°C ocorreu expressão de necrose e aumento do acúmulo de RNA viral no sítio inoculado, enquanto em temperaturas entre 15 e 20°C a expressão de sintomas e acúmulo de RNA viral diminuíram. No entanto, os efeitos da temperatura podem variar conforme o patossistema. Dahal e colaboradores (1998) observaram que bananeiras infectadas pelo banana streak virus (BSV, *Badnavirus*), quando mantidas a 22°C, exibiram sintomas severos. Porém, ao serem

transferidas para temperaturas entre 28 e 35°C, os sintomas diminuíram e, em alguns casos, desapareceram. Os efeitos da temperatura em plantas infectadas por vírus podem ser variados, modulando o silenciamento gênico nas interações vírus-hospedeira, que podem levar a um aumento da replicação viral (Zhang et al. 2016). Além disso, a presença de diferentes populações virais em uma mesma planta pode favorecer a recombinação e rearranjos, que levam a um aumento da variabilidade genética viral, podendo favorecer a uma melhor adaptação do(s) vírus no ambiente (Codoñer & Elena 2008). A temperatura pode influenciar nas interações entre diferentes vírus (pertencentes a espécies virais distintas) infectando a mesma planta (coinfecções), causando efeitos que podem ser sinérgicos ou antagônicos, influenciando diretamente na expressão de sintomas e na replicação viral (Hull 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que em um regime com temperaturas mais elevadas (30°C durante 12 horas de luz) as plantas inoculadas com o isolado de CoMMV tornaram-se mais susceptíveis à infecção viral, causando um atraso ou diminuição no desenvolvimento das plantas, enquanto em temperaturas mais baixas (20°C durante 12 horas de luz) as plantas conseguiram suprimir os possíveis efeitos causados pela infecção viral. Em ambos os experimentos, trinta dias após as inoculações, não houve diferença estatística entre as plantas inoculadas e as testemunhas, indicando que a planta, de alguma forma, consegue controlar a infecção viral após esse período.

7. CONCLUSÕES

- i. As análises de viroma contribuíram para ampliar o conhecimento sobre a diversidade de vírus que infectam brássicas no Brasil, e evidenciaram a ocorrência de coinfeccões. Este é o primeiro registro de sequência completa do genoma do CoMMV, vírus que pertence a uma nova putativa espécie do gênero *Carlavirus*, descrita pela primeira vez no Brasil e no mundo; Primeiro registro da sequência completa do genoma do brassica napus RNA virus 1 (BnRV1), espécie de *Waikavirus*, descrita pela primeira vez ocorrendo em brássicas no Brasil e descrita pela segunda vez ocorrendo no mundo; Além disso, também é o primeiro registro da ocorrência do *Cabbage cytorhabdovirus 1* (CCyV-1), espécie de *Cytorhabdovirus*, descrita pela primeira vez ocorrendo em brássicas no Brasil e descrita pela segunda vez ocorrendo no mundo.
- ii. As análises de viroma permitiram a ampliação do conhecimento da distribuição geográfica desses vírus e a descoberta de novas espécies virais até então não relatadas ocorrendo nos campos de produção de brássicas no Brasil.
- iii. As análises das sequências, organizações genômicas e filogenia, confirmaram que os isolados T25, T107 e T110 pertencem a uma espécie nova de carlavírus nominada *Cole mild mosaic virus*, e que o isolado T90 pertence à espécie *Cole latent virus*;
- iv. Diante do levantamento e análises realizadas, constatou-se que o CoLV, CoMMV, BnRV1 e o TuYV encontram-se disseminados em áreas de cultivo de brássicas no Brasil;
- v. Por meio da avaliação do efeito da temperatura na expressão de sintomas do CoMMV_T25, observou-se que em temperaturas mais altas (regime de 30°C por 12 horas de luz) e baixas (regime de 20°C por 12 horas de luz) não ocorreu a expressão de sintomas perceptíveis.

- vi. Nos experimentos de avaliação dos efeitos da temperatura na infecção viral, observou-se que no regime de temperaturas mais elevadas (30°C por 12 horas de luz), as plantas inoculadas com o isolado de CoMMV tornaram-se mais susceptíveis à infecção viral, promovendo um atraso ou redução no desenvolvimento das plantas, enquanto em regime de temperaturas mais baixas (20°C por 12 horas de luz) as plantas conseguiram suprimir os possíveis efeitos causados pela infecção viral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M. J.; Antoniw, J. F.; Bar-Joseph, M.; Brunt, A. A.; Candresse, T.; Foster, G. D.; et al. (2004). The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch. Virol.* 149:1045–1060.

Adams, M. J. ; Candresse, T. ; Kreuze, J. F. ; Martelli, G. P. ; Namba, S. ; Pearson, M. N. et al. (2012). *Genus Carlavirus*. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. & Lefkowitz, E.J. (Eds.) *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Agrianual. (2013). Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP. :480.

Ali, M.; Anwar, S. and Shuja, M. N. (2018). The genus Luteovirus from infection to disease.

Andika, I. B.; Sun, L.; Xiang, R.; Li, J. and Chen, J. (2013). Root-specific role for *Nicotiana benthamiana* RDR6 in the inhibition of Chinese wheat mosaic virus accumulation at higher temperatures. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:1165–1175.

Araújo, Aco. (2011). Nova abordagem para expressão da partícula sSHbsAg do antígeno HBsAg do vírus da hepatite B em células de inseto.

Ávila, A. C.; Inoue-Nagata, A. K.; Neves, F. M.; Matos, L. G.; Dias, R. C. S.; Rangel, M. et al. (2008). Produção de anti-soro e detecção por DAS-ELISA do Melon yellowing associated virus em meloeiro. *Trop. Plant Pathol.* 33:245-247.

Aylward, F.O.; Moniruzzaman, M. (2022). Viral complexity. *Biomolecules*, 12(8), 1061.

Azzam, O. and Chancellor, T. C. B. (2002). The Biology, Epidemiology, and Management of Rice Tungro Disease in Asia. *Plant Dis.* 86.

Badge, J.; Brunt, A.; Carson, R.; Dagless, E.; Karamagioli, M.; Phillips, S. et al. (1996). A carlavirus-specific PCR primer and partial nucleotide sequence provides further evidence for the recognition of cowpea mild mottle virus as a whitefly-transmitted carlavirus. *Eur. J. Plant Pathol.* 102:305–310.

Bak, A and Emerson, J.B. (2020). Cauliflower mosaic virus (CaMV) Biology, Management, and Relevance to GM Plant Detection for Sustainable Organic Agriculture. *Front. Sustain. Food Syst.* 4:21.

Belintani, P. and Gaspar, J. O. (2003). Coat protein and RNAs of Cole latent virus are not present within chloroplasts of *Chenopodium quinoa*-infected cells. *Fitopatol. Bras.* 28:84–88.

Belintani, P.; Gaspar, J. O.; Targon, M. L. P. N. and Machado, M. (2002). Evidence supporting the recognition of Cole latent virus as a distinct Carlavirus. *J. Phytopathol.* 150:330–333.

Bragard, C.; Caciagli, P.; Lemaire, O.; Lopez-Moya, J. J.; MacFarlane, S.; Peters, D. et al. (2013). Status and Prospects of Plant Virus Control Through Interference with Vector Transmission. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:177–201.

Brighenti, and Oliveira. (2011). *Biologia de plantas daninhas*. In: OLIVEIRA, R.S Jr. et al. (Eds). *Biologia e Manejo de plantas daninhas*. In , p. 1–36.

Brown, J.C. (2001). *Virology*. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA. 1-9.

Brunt, A. A.; Crabtree, K.; Dallwitz, M. J.; Gibbs, A. J. and Watson, L. (1997). *Virus of Plants: Descriptions and List from the VIDE Database*. Cambridge, UK. 83.

Burand, J. P.; Summers, M. D. and Smith, G. E. (1980). Transfection with baculovirus DNA. *Virology.* 101:286–290.

- Caballero, B.;Finglas, P. and Toldrá, F. (Eds.). (2015). *Encyclopedia of food and health*. 1st ed. Academic Press.
- Cai, L.; Weinbauer, M.G.; Xie, L.; Zhang, R. (2023). The smallest in the deepest: the enigmatic role of viruses in the deep biosphere. *National Science Review*,10(4), nwad009.
- Camargo Filho, W. P. and Camargo, F. C. (2011). Acomodação da produção olerícola no Brasil e em São Paulo, 1990-2010. Análise, Perspectiva e Tendências 2015. Inst. Econ. Agrícola, (2010). Available at: <http://www.abhorticultura.com.br> [Accessed November 10, 2015]. 1:1–24.
- Carrijo, I. V. and Rêgo, A. M. (2000). *Doenças das brássicas*. In: Zambolim, L.; Vale, F. X. R.; Costa, H. (Ed.). *Controle de doenças de plantas hortaliças*. Viçosa, MG: UFV.
- Clark, M. F.; Lister, R. M., and Bar-Joseph, M. (1986). ELISA techniques. In: Weissbach A, Weissbach HW (eds) *Methods in enzymology*. Acad. Press. London. 118:742–766.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475–483.
- Coetzee, B.; Freeborough, M-J.; Maree, H-J.; Celton, J-M.; Rees, D.J.G.; Burger, J.T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology* 400, 157-163.
- Codoñer, F. M., and Elena, S. F. (2008). The promiscuous evolutionary history of the family Bromoviridae. *J. Gen. Virol.* 89:p.1739–1747.
- Colariccio, A., Eiras, M., Vicente, M., Chagas, C. M., and Harakava, R. (1996). Caracterização parcial de um isolado do vírus do mosaico do pepino de Musa sp. “nânico”. *Fitopatol. Bras.* 21:238–274.

Conab. (2016). CONAB PROHORT. Programa brasileiro de modernização do mercado hortigranjeiro. Available at: <http://dw.prohort.conab.gov.br/pentaho/Prohort> [Accessed November 30, 2016].

Congdon, B. S.; Kehoe, M. A.; Filardo, F. F. and Coutts, B. A. (2019). In-field capable loop-mediated isothermal amplification detection of Turnip yellows virus in plants and its principal aphid vector *Myzus persicae*. *J. Virol. Methods*. 265:15–21 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.014>.

Cooper, H. M. and Patterson, Y. (2008). Production of Polyclonal Antisera. *Currant Protoc. Immunol.* 2.4.1:1–10.

Costa, A. S.; Kitajima, E. W.; Costa, C. L. and Nagai, H. (1972). A couve comum como fonte de tres virus que afetam cruciferas. *Rev. Oleric.* 12:82.

Costa, C. L.; Cupertino, F. P.; Kitajima, E. W. and Mattos, J. K. (1974). Ocorrência de vírus de crucíferas e compostas hortícolas no Distrito Federal. *Fitopatol.* 9:49–49.

Cupertino, F. P.; Ávila, A. C. de; Araújo, M. T. and Maluf, W. R. (1986). Fontes de resistência ao vírus de vira-cabeça em *Lycopersicon*. *Fitopatol. Bras.* 11:330–331.

Chaudhari, H.G.; Prajapati, S.; Wardah, Z.H.; Raol, G.; Prajapati, V.; Patel, R.; Shati, A.A.; Alfaiji, M.Y.; Elbehairi, S.E.I.; Sayyed, R.Z. (2023). Decoding the microbial universe with metagenomics: a brief insight. *Front. Genet.* 14:1119740.

Dáder, B., Then, C., Berthelot, E., Ducouso, M. ., NG, J. C. K. ., and Drucker, M. 2017. Insect transmission of plant viroses: multilayered interactions optimize viral propagation. *Insect Sci.* 24:929–949. 84.

Dahal, G.; Hughes, J. d'A. and Thottappilly, G. (1998). Effect of temperature on symptoms expression and reability of Banana Streak Badnavirus detection in naturally infected Plantain and Banana (*Musa spp.*). *Plant Dis.* 82:16–21.

Daniels, J.; Caldas, L. S. and Kitajima, E. W. (1978). Plantas de alho (*Allium sativum*) supostamente sadias, obtidas de meristemas de bulbilhos infectados por vírus. *Fitopatol. Bras.* 3:82.

Delfosse, V. C.; Barrios, M. P. and Ana, B. (2021). What we know about poleroviruses : Advances in understanding the functions of polerovirus proteins. *Plant Pathol.* 70:1047–1061.

Dixon, G. (2006). *Origins and diversity of Brassica and its relatives. In: Dixon, G.R. (Ed.) Vegetable Brassicas and Related Crucifers.* CABI, Wallingford.

Dusi, A. N.; Fajardo, T. V. M. and Cupertino, F. P. (1994). Serological Identification of Garlic (*Allium sativum* L.) Viruses in Brazil. *Fitopatol. Bras.* 19:298.

Eigenbrode, S. D.; Bosque-Pérez, N. A. and Davis, T. S. (2018). Insect-borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 63:169–191.

Eiras, M.; Chaves, A. L. R.; Colariccio, A. and Chagas, C. (2007). First Report of Turnip mosaic virus in horseradish in Brazil. *Fitopatol. Bras.* 32:165.

Eiras, M.; Chaves, A. L. R.; Colariccio, A.; Harakava, R. and ; Chagas, C. M. (2008). Primeiro relato do Cole latent virus em raiz-forte. *Trop. Plant Pathol.* 33(supl):S290.

Eiras, M.; Dianese, E. C.; and Pereira-Carvalho, R. C. (2018). Resistência genética de plantas a vírus. In *Resistência genética de plantas a patógenos*, ed. Leandro José Dallagnol. Pelotas, RS: Editora UFPel (Universidade Federal de Pelotas), p. 296–358.

Enquist, A.J.L.L.W. (2007). História de Virologia – BMM 0586. *Fields Virology.* 5ª Edição. 1-91.

Fei, Y.; Pyott, D. E.; Molnar, A. (2021). Temperature modulates virus-induced transcriptional gene silencing via secondary small RNAs. *New Phytologist.* 232: 356-371. doi: 10.1111/nph.17586.

- Fenner, F. (2009). History of Virology: Vertebrate Viruses. In: Mahy & Van Regenmortal. Desk Encyclopedia of General Virology. Oxford, UK: Academic Press.
- Filgueira, F. A. R. (2008). *Novo Manual de Olericultura. 3a Edição*. Viçosa, MG: UFV.
- Fingu-Mabola, J. C. and Francis, F. (2021). Aphid–plant–phytovirus pathosystems: influencing factors from vector behaviour to virus spread. *Agriculture*. 11:502.
- Foster, G. D. (1992). The structure and expression of the genome of carlaviruses. *Res. Virol.* 143:103–112.
- Fujihara, R. T.; Orti, L. C.; Almeida, M. C. de; and Baldin, E. L. L. (2011). (Ed.). *Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias*. Botucatu: FEPAF.
- Gallo, D.; Nakano, O; Silveira Neto, S.; Carvalho, R. P. L.; Batista, G. C.; Berti Filho, E. et al. (2002). *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: ESALQ.
- Gama, M. I. C.; E.W, K.; Ávila, A. C. and Lin, M. T. (1983). Um Carlavirus em Seringueira (*Hevea brasiliensis*). *Fitopatol. Bras.* 8:621.
- Garcêz, R. M.; Chaves, A. L. R.; Eiras, M.; Meletti, L. M. M.; Azevedo Filho, J. A.; Silva, L. A., et al. (2015). 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. *Springer Plus (Biomedical Life Sci.* 4:537. 85.
- Gaspar, J. O., Belintani, P., Almeida, A. M. R., and Kitajima, E. W. 2008. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. *J. Virol. Methods.* 148:283–285.
- Gómez, P.; Sempere, R. N.; Elena, S. F. and Aranda, M. A. (2009). Mixed infections of Pepino mosaic virus strains modulate the evolutionary dynamics of this emergent virus. *J. Virology.* 83:p.12378–12387.

Granados, R. R.; Guoxun, L.; Derksen, A. C. G. and McKenna, K. A. (1994). A New Insect Cell Line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) Susceptible to *Trichoplusia ni* Single Enveloped Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Invertebr. Pathol.* 266:260–266.

Gray, A. R. (1982). Taxonomy and evolution of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Econ. Bot.* 36:397–410.

Green, M., and Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*.

Greene, G. L.; Leppla, N. C. and Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. 69:487–488.

Greer, S. F.; Newbert, M. J.; Rodrigues, L. K.; Oliveira, A. M.; Chaves, A. L. R.; Calegario, R. F. et al. (2021). First Report of Turnip Yellow Virus in Brazil *Journal: New Dis. Reports.* 44:e12045.

Hass, M.; Bureau, M.; Geldreich, A.; Yot, P.; Keller, M. (2002). Cauliflower mosaic virus: still in the news. *Molecular Plant Pathology* 3(6), 419-429.

Haas, B. J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P. D.; Bowden, J., et al. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8:1494–512.

Hasiów-Jaroszewska, B.; Boezen, D.; Zwart, M.P. (2021). Metagenomic Studies of Viruses in Weeds and Wild Plants: A Powerful Approach to Characterise Variable Virus Communities. *Viruses*, 13, 1939.

Hasiów-Jaroszewska, B.; Boezen, D.; Zwart, M.P. (2021). Metagenomic Studies of Viruses in Weeds and Wild Plants: A Powerful Approach to Characterise Variable Virus Communities. *Viruses*. Sep 27;13(10):1939.

Hedge, I. C. (1976). A systematic and geographical survey of old world Cruciferae. In Vaughan, J. G.; Macleod, A. J.; Jones, B. M. G. (Eds.) *The Biology and Chemistry of the Cruciferae*, p. 1–46.

Hibino, H. (1996). BIOLOGY AND EPIDEMIOLOGY. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:279–274.

Hoffmann-Campo, C.; Oliveira, L.; Moscardi, F.; Gazzoni, D.; Corrêa-Ferreira, B.; Lorini, I., et al. (2003). Integrated pest management in Brazil. In *Integrated pest management in the global arena*, CABI Publishing, Wallingford and Cambridge, p. 285–299.

Hull, R. (2014). *Plant Virology*. 5th Ed. San Diego, CA: Academic Press.

Hunt, R. E. and Nault, L. R. (1990). Influence of Life History of Grasses and Maize Chlorotic Dwarf Virus on the Biotic Potential of the Leafhopper *Graminella nigrifrons* (Homoptera : Cicadellidae). *Environ.Entomo.* 19:76–84.

ICTV. (2022). International Committee on Taxonomy of Viruses.

ICTV. (2023). International Committee on Taxonomy of Viruses.

IEA, I. de E. A. (2019). Estatísticas da produção paulista. Available at: www.iea.sp.gov.br.

Igori, D.; Lim, S.; Zhao, F.; Baek, D.; Park, J. M.; Cho, H. S. et al. (2016). The complete sequence and genome organization of ligustrum virus A, a novel carlavirus. *Arch. Virol.* 161:3593–3596. 86.

Inoue-Nagata, A.K.; Jordan, R.; Kreuze, J.; Li, F.; López-Moya, J. J.; Makinen, K.; Ohshima, K.; Wylie, S.J. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*. (2022). V. 105, 5.

Jeger, M. (2020). The epidemiology of plant virus disease: towards a new synthesis. *Plants.* 9:1768.

Jeyanandarajah, P. and Brunt, A. A. (1993). The natural occurrence, transmission, properties and possible affinities of Cowpea mild mottle virus. *J. Phytopathol.* 137:148– 156.

Jo, Y.; Choi, H.; Kim, S. and Al, E. (2017). The pepper virome: natural co-infection of diverse viruses and their quasispecies. *BMC Genomics*, 18:453.

Jones RAC. (2021). Global plant virus disease pandemics and epidemics. *Plants* (Basel), 10(2), 233.

Joseph, S., and David, W. R. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*.

Juárez, M.; Eguía, P.; Mengual, C.; Assem, M.; Sempere, R. G.; Mez, P. et al. (2013). Relative incidence, spatial distribution and genetic diversity of cucurbit viruses in eastern Spain. *Ann. Appl. Biol.* 162:362–370.

Kaneko, Y. and Matsuzawa, Y. (1993). Radish: *Raphanus sativus* L. In *Kaloo, G.; Bergh, B.O. (Eds.) Genetic Improvement of Vegetable Crops*, Pergamon, Oxford, p. 487–510.

Kapoor, Amit; and Lipkin, W Ian. (2014) *Virus Discovery in the 21st Century*. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 1-9.

Katoh, K., and Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30:772–780.

Katsarou, K.; Bardani, E.; Kallemi, P.; Kalantidis, K. (2019). *Viral Detection: Past, Present, and Future*. *BioEssays* , 41, 1900049, 1-18.

Kawakubo, S.; Gao, F.; Li, S.; Tan, Z.; Huang, Y. K.; Adkar-Purushothama, C. R. et al. (2021). Genomic analysis of the brassica pathogen turnip mosaic potyvirus reveals its spread along the former trade routes of the Silk Road. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118:e2021221118.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-havas, S., Sturrock, S., Buxton, S., et al. (2012). Geneious Basic : An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28:1647–1649.

Kitajima, E. W. (2020). An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). *Biota Neotrop*. 20.

Kitajima, E. W.; Camargo, I. J. B. and Costa, A. S. (1970). Morfologia e aspectos intracelulares do vírus latente da couve. *Bragantia*. 29:181–190.

Krupovic M.; Dolja V.V.; Koonin E.V. (2019). Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from host. *Nature Rev. Microbiol*. 17, 449-458.

Kutnjak, D.; Tamisier, L.; Adams, I.; Boonham, N.; Candresse, T.; Chiumenti, M.; De Jonghe, K.; Kreuze, J.F.; Lefebvre, M.; Silva, G.; et al. (2021). A Primer on the Analysis of High-Throughput Sequencing Data for Detection of Plant Viruses. *Microorganisms*, 9, 841.
Lai, X.; Wang, H.; Wu, C.; Zheng, W.; Leng, J.; Zhang, Y.; Yan, L. (2022) Comparison of Potato Viromes Between Introduced and Indigenous Varieties. *Front. Microbiol*. 13:809780.

Liao, R.; Chen, Q.; Zhang, S.; Cao, M. and Zhou, C. (2021). Complete genome sequence of camellia virus A, a tentative new member of the genus Waikavirus. *Arch. Virol*. 166:3207–3210.

Lima, M. F.; Nagata, T.; Neves, F. M.; Inoue-Nagata, A. K.; Moita, A. C.; Sousa, C. et al. (2009). Occurrence of Melon yellowing-associated virus (MYaV) in melon producing areas of brazilian northeast. *Trop. Plant Pathol*. 34:S278.

Li, G.; Lv, H.; Zhang, S.; Zhang, S.; Li, F.; Zhang, H.; Qian, W.; Fang, Z.; Sun, R. TuMV management for brassica crops through host resistance: retrospect and prospects. (2019). *Plant Pathology*. 68, 1035-1044.

Lin, M. T.; Kitajima, E. W.; Cupertino, F. P. and Costa, C. L. (1979). Properties of a possible carlavirus isolated from a cerrado native plant *Cassia sylvestris*. *Plant. Dis. Rep.* 63:501–505.

Mabry, M. E.; Turner-Hissong, S.D.; Gallagher, E. Y.; McAlvay, A. C.; An, H.; Edger, P. P.; Moore, J. D. et al. (2021). The Evolutionary History of Wild, Domesticated, and Feral *Brassica oleracea* (Brassicaceae). *Mol. Biol. Evol.* 38:p.4419–4434. 87.

Madeira, N. R.; Reifschneider, F. J. B. and Giordano, L. B. (2008). Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. *Hortic. Bras.* 26:428–432.

Mascia, T., and Gallitelli, D. (2016). Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Sci.* 252:176–192.

Mayo, M. A., and Ziegler-GraW, V. (1996). MOLECULAR BIOLOGY OF LUTEOVIRUSES. *Adv. VIRUS Res.* VOL. 46.

Mehetre, G.T.; Leo, V.V.; Singh, G.; Sorokan, A.; Maksimov, I.; Yadav, M.K.; Upadhyaya, K.; Hashem, A.; Alsaleh, A.N.; Dawoud, T.M.; et al. (2021). Current Developments and Challenges in Plant Viral Diagnostics: A Systematic Review. *Viruses*, 13, 412. <https://doi.org/10.3390/v13030412>.

Mello, S. C. M.; Cupertino, F. P.; Kitajima, E. W. and Lin, M. T. (1987). Propriedades biológicas e microscopia eletrônica do vírus latente da couve. *Fitopatol. Bras.* 12:353–360.

Melo, R. A. C.; Vendrame, L. P. C.; Madeira, N. R.; Blind, A. D. and Vilela, N. J. (2019). Characterization of the Brazilian vegetable brassicas production chain. *Hortic. Bras.* 37:366–372.

Miller, W. A. (1999). *Luteovirus* (Luteoviridae).

Miller, W. A.; Brown, C. M. and Wang, S. (1997). New Punctuation for the Genetic Code : *Luteovirus* Gene Expression. 13:3–13.

Miranda, J. E.; Suassuna, N. D.; Morello, C. L.; Silva, M. V. F. and Freire, E. C. (2008). Doença Azul do Algodoeiro: Novos Aspectos a Serem Considerados no Manejo 121. Embrapa Algodão. 1–12.

Mituti, T. (2009). Levantamento das principais viroses na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e caracterização de carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil. Aleph. Available at: <http://hdl.handle.net/11449/97209>.

Moreno, A. B., and pez-Moya, J. J. (2020). When viruses play team sports: mixed infections in plants. *Phytopathology*. 110:29–48.

Moubset, O.; François, S.; Maclot, F.; Palanga, E.; Julian, C.; Claude, L.; Fernandez, E.; Rott, P.C.E.; Daugrois, J.H.; Antoine-Lorquin, A.; Bernardo, P.; Blouin, A.G.; Temple, C.; Kraberger, S.; Fontenele, R.S.; Harkins, G.W.; Marais, A.; Candresse, T.; Ben, Chéhida, S.; Lefeuvre, P.; Lett, J.M.; Varsani, A.; Massart, S.; Ogliastro, M.H.; Martin, D.P.; Filloux, D. (2022). Roumagnac, P. Virion-associated nucleic acid-based metagenomics: a decade of advances in molecular characterization of plant viruses. *Phytopathology*, 112(11), 2253-2272.

Murant, A. F. and Goold, R. A. (1968). Purification, properties and transmission of parsnip yellow fleck, a semi -persistent, aphid-borne virus. *Ann. appl. Bid.* 62:123–137.

Murant, A. F. ., and Roberts, I. M. (1977). Virus-like particles in phloem tissue of chervil (*Ant hriscus cerefolium*) infected with anthriscus yellows virus. *Ann. appl. Bid.* 85:403– 406.

Nagaharu, U. (1935). Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan. J. Bot.* 7:389–452.

Nagata, T.; Alves, D. M. T.; Inoue-Nagata, A. K.; Tian, T. Y.; Kitajima, E. W.; Cardoso, J. E. et al. (2005). A novel flexivirus transmitted by whitefly. *Arch. Virol.* 150:379–387.

Nakagawa, S.; Sakaguchi, S.; Ogura, A.; Mineta, K.; Endo, T.; Suzuki, Y.; Gojobori T. (2023). Current trends in RNA virus detection through metatranscriptome sequencing data. *FEBS Open Bio*. Jun;13(6):992-1000.

Newbert, M. J. (2016). The genetic diversity of Turnip yellows virus in oilseed rape (*Brassica napus*) in Europe, pathogenic determinants, new sources of resistance and host range.

Nicaise, V. (2017). Boosting innate immunity to sustainably control diseases crops. *Curr. Opin. Virol.* 26:112–119.

Nunes, S. P. (2017). Desenvolvimento da Agricultura Brasileira e Mundial e a Idéia de Desenvolvimento Rural. Available at: <http://www.deser.org.br/documentos/doc/DesenvolvimentoRural.pdf>.

Oliveira, A. M.; Rodrigues, L. K.; Chabi-Jesus, C.; Chaves, A. L. R.; Kitajima, E.W.; Harakava, R. and Banguela-Castillo, A.; Ramos-González, P.L.; Eiras, M. (2022). Biological and molecular characterization of two closely related carlaviruses affecting brassica plants. *Plant Pathol.* 71:479–493.

Oliveira, A. M. de. (2019). Identificação e caracterização de dois isolados de cole latent virus que infectam brássicas. Dissertação de Mestrado. Instituto Biológico. São Paulo, SP. 84.

Owens, R.A.; Diener, T.O. (1981). Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. **Science**, Washington DC, v.213, p.670-672.

Pagán, I & García-Arenal, F. (2018). Population Genomics of Plant Viruses. In: Polz, M., Rajora, O. (eds) *Population Genomics: Microorganisms*. Population Genomics. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/13836_2018_15.

Pakash, S.; Wu, X.-M. and Bhat, S. R. (2011). History, evolution, and domestication of Brassica crops. In *Janick, J. (Ed.) Plant Breeding Review*, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, p. 19–84.

Pallás, V.; Sánchez-Navarro, J. A. and James, D. (2018). Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Front. Microbiol.* 9:2087.

Palukaitis, P. and Kim, S. (2021). Resistance to turnip mosaic virus in the family Brassicaceae. *Plant Pathol. J.* 37:p.1-23.

Park, D., and Hahn, Y. (2019). A novel Waikavirus (the family Secoviridae) genome sequence identified in rapeseed (*Brassica napus*). *Acta Virol.* 63:211–216.

Pasqual, M.; Dutra, L. F.; Araújo, A. G. and Pereira, A. R. (2010). *Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA J.E (Ed.) Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas.* Brasília: Embrapa.

Paudel, D. B., and Sanfaçon, H. (2018). Exploring the diversity of mechanisms associated with plant tolerance to virus infection. *Front. Plant Sci.* 9:1575.

Petersen, E.; Koopmans, M.; Go, U.; Hamer, D.H.; Petrosillo, N.; Castelli, F.; Storgaard, M.; Al Khalili, S.; Simonsen, L. (2020). Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis.* 20(9), e238-e244.

Peronti, A. L. B. G., and Sousa- Silva, C. R. (2002). Aphis (Hemiptera: Aphidoidea) of ornamental plants from São Carlos, São Paulo state, Brazil. *Rev. Biol. Trop.* 50:137–144.

Picolotto, E. L. (2015). Os atores da construção da categoria agricultura familiar no Brasil. *Rev. Econ. e Sociol. Rural.* 52:63–84.

Provvidenti, R. (1996). Turnip mosaic potyvirus. In *Brunt, A.A; Crabtree, K.; Dallwitz, M.J.; Gibbs, A.J.; Watson, L. (Eds.) Viruses of Plants.*, Wallingford, UK: CAB International, p. 1340–1343.

Rafael, J. A., Melo, G. A. R. ., De Carvalho, C. J. B., Casari, S. A., and Constantino, R. (2012). *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia.* Ribeirão Preto. Holos.

Raza, A. and Shahid, M.S. (2020). Next-generation sequencing Technologies and plant molecular virology: a practical perspective. *Plant molecular virology*. Chapter 10, 1-10.

Ray, S.; Casteel, C.L. (2022). Effector-mediated plant–virus–vector interactions. *The Plant Cell* **34**, 1514–1531.

Rimmer, S. R.; Shattuck, V. I. and Buchwaldt, L. (Eds). (2007). *Compendium of 89 Brassica diseases*. American Phytopathological Society, APS Press.

Rivarez, M. P.S.; Pecman, A.; Bačnik, K.; Maksimović, O.; Vučurović, A.; Seljak, G.; Mehle, N.; Gutierrez-Aguirre, I.; Ravnikar, M.; Kutnjak, D. (2023). In-depth study of tomato and weed viromes reveals undiscovered plant virus diversity in an agroecosystem. *Microbiome*. 11:60.

Rodrigues, L. K.; Chaves, A. L. R.; Brunelli, K. R.; Harakava, R.; Kitajima, E. W.; Walsh, J. A. et al. (2015). Turnip mosaic virus infecting Chinese cabbage in the State of São Paulo: genetic diversity and incidence. *Virus Rev. Res.* 20:194.

Rodrigues, L. K.; Chaves, A. L. R.; Kitajima, E. W.; Calegario, R. F.; Brunelli, K. R.; Silva, F. N. et al. (2021). Characterisation of turnip mosaic virus isolates reveals high genetic variability and occurrence of the pathotype 1 in Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 160:883–900.

Roux S, Emerson JB. (2022). Diversity in the soil virosphere: to infinity and beyond? *Trends Microbiol.* Nov;30(11):1025-1035.

Rubio, L.; Galipienso, L., and Ferriol, I. (2020). Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Front. Plant Sci.* 11:1092.

Rudzinska-Langwald, A. (1990). Cytological changes in phloem parenchyma cells of *Solanum rostratum* (Dunal.) related to the replication of potato virus M (PVM). *Acta Soc. Bot. Pol.* 59:45–53.

Sanfaçon, H.; Wellink, J.; Gall, O. L.; Karasev, A.; Vlugt, R. van der.; and Wetzels, T. (2009). Secoviridae : a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that

combines the families Sequiviridae and Comoviridae , the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus , and the proposed genus Torradovirus. *Arch. Virol.* 154:899– 907.

Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1997). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463–5467.

Scholthof, K-B.; Adkins, S.; Czosnek, H.; Palukaitis, P.; Jacquot, E.; hohn, B.; Saunders, K.; Candresse, T.; Ahlquist, P.; Hemenway, C.; Foster, G.D. (2011). 10 plant virus in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology.* 12(9), 938-954.

Seabra, P, V.; Rivas, E. B.; Duarte, L. M. L.; Gallet, S. R. and Alexandre, M. A. (2001). Detecção de Carlavirus em *Senna macranthera*. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.* 7:67-71.

Seo, J.-K.; Kwak, H.-R.; Lee, Y.-J.; Kim, J.; Kim, M.-K.; Kim, C.-S., et al. (2015). Complete genome sequence of bellflower vein chlorosis virus , a novel putative member of the genus Waikavirus. *Arch. Virol.* 160:3139–3142.

Shattuck, V. I. (1992). The Biology, Epidemiology, and Control of Turnip Mosaic Virus. *Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)* 14:199–238.

Shinkai, B. A. (1977). Rice W aika , A New Virus Disease , and Problems related to Its Occurrence and Control. *Jarq.* 11.

Shyam, P.; Wu, X. M. and Bhat, S. R. (2012). History, evolution, and domestication of 90 Brassica crops. *Plant Breed Rev.* 35:19–84.

Da Silva, L. A.; Oliveira, A. S.; Melo, F. L.; Ardisson-Araújo, D. M. P.; Resende, F. V.; Resende, R. O., et al. (2019). A new virus found in garlic virus complex is a member of possible novel genus of the family Betaflexiviridae (order Tymovirales) . *PeerJ.* 7:e6285.

Singh, A.; Permar, V.; Basavaraj; Tomar, B. S. and Praveen, S. (2018). Effect of temperature on symptoms expression and viral RNA accumulation in Groundnut bud necrosis virus infected *Vigna unguiculata*. *Iran. J Biotech.* 16:e1846.

Smith, K. M. (1931). On the compositenature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission. Proc. R. Soc. London B. 109:251–266.

Souza, V. C., and Lorenzi, H. (2008). *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2nd ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Spence, N.J.; Phiri, N.A.; Hughes, S.L.; Mwaniki, A.; Simons, S.; Oduor, G.; Chacha, D.; Kuria, A.; Nidirangu, S.; Kibata, G.N.; Marris, G.C. Economic impact to *Turnip mosaic virus*, *Cauliflower mosaic virus* and *Beet mosaic virus* in three Kenyan vegetables. (2007). Plant Pathology. V.56, 2:317-323.

Stewart, L. R. (2011). Waikaviruses: Studied but not understood. APS Featur.

Taliansky, M.; Mayo, M. A. and Barker, H. (2003). Potato leafroll virus: a classic pathogen shows some new tricks. Mol. Plant Pathol. 4:81–89.

Teycheney, P-Y.; Geering, A. D. W.; Dasgupta, I.; Hull, R.; Kreuze, J. F.; Lockhart, B.; Muller, E.; Olszewski, N.; Pappu, H.; Pooggin, M.M.; Richert-Pöggeler, K. R.; Schoelz, J.E.; Seal, S.; Stabolone, L.; Umber, M. ICTV Report Consortium. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Caulimoviridae*. Journal of General Virology. V.101, 10.

Thekke-veetil, T.; Ho, T. and Joseph, D. (2020). Blackcurrant waikavirus A, a new member of the genus Waikavirus, and its phylogenetic and molecular relationship with other known members. Eur J Plant Pathol. 157:59–64.

Thompson, J. R.; Dasgupta, I.; Fuchs, M.; Iwanami, T.; Karasev, A. V, and Petrzik, K. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile : Secoviridae. 529–531.

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

Tomlinson, J. A. (1987). Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. Assoc.

Appl. Biol. 110:661–681.

Tu, J. C., and Hiruki, C. (1970). Ultrastructure of potato infected with potato virus M. *Virology*. 42:238–242.

Villamor, D.E.V.; Ho, T.; Rwahnih, M.Al.; Martin, R.R.; Tzanetakis, I.E. (2019). High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery. *Phytopathology*. 109(5):716-725.

ViralZone. (2022). Bioinformatics Resource Portal. Positive Strand RNA Viruses.

ViralZone. (2023). Bioinformatics Resource Portal. Positive Strand RNA Viruses.

Walsh, J.; Richards, A.; Sharpe, C.; Kevitt-Jack, J.; Jones, J. D. G., and Mead, A. (2011). The incidence of Turnip yellows virus (TuYV) in overwintered cauliflower and Brussels sprout and the effect of the virus on yield quality and storage - Phase 1. :1–11 Available at: <https://ahdb.org.uk/fv-365-the-incidence-of-turnip-yellows-virus-tuyv-in-overwinteredcauliflower-and-brussels-sprout-and-the-effect-of-the-virus-on-yield-quality-and-storagephase-1>. [Accessed September 27, 2021].

Walsh, J. A.; Rachael, L.; Rusholme, R. L.; Hughes, S. L.; Jenner, C. E.; Bambridge, J. M., et al. (2002). Different classes of resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:15–20.

Wang, J.; Turina, M.; Medina, V. and Falk, B. (2009). Synergistic interaction between the potyvirus, turnip mosaic virus and crinivirus, lettuce infectious yellows virus in plants and protoplasts. *Virus Res.* 163–170. 91.

Weintraub, M. (1993). A carlavirus and a rhabdovirus infecting *Lonicera x brownii* cv. Dropmore Scarlet in western Canada. *J. Phytopathol.* 139:57–67.

Whitfield, A. E.; Falk, B. W. and Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*. 479:278–289.

Xue, M.; Arvy, N.; German-Retana, S. The mystery remains: How do potyviruses move within and between cells? (2023). *Molecular Plant Pathology*. 00:1-15.

Yasaka, R.; Fukagawa, H.; Ikematsu, M.; Soda, H.; Korkmaz, S.; Golnaraghi, A. et al. (2017). The timescale of emergence and spread of turnip mosaic potyvirus. *Sci. Rep.* 26:p.4240.

Zanardo, L. G., and Carvalho, C. M. (2017). Cowpea mild mottle virus (*Carlavirus*, *Betaflexiviridae*): a review. *Trop. Plant Pathol.* 42:417–430.

Zawadneak, M. A. C.; Schuber, J. M.; Medeiros, C., and Silva, R. A. da; (2015). *Olericultura: Pragas e inimigos naturais*. 70.

Zimmerman, A.E.; Howard-Varona, C.; Needham, D.M.; et al. (2022). Metabolic and biogeochemical consequences of viral infection in aquatic ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 21-34.

Zhang, X.; Zhang, X.; Singh, J.; Li, D. and Qu, F. (2012). Temperature-dependent survival of turnip crinkle virus-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing-based defense that requires DCL2, AGO2, and HEN1. *J. Virol.* 6847–6854.

Zhou, J. S.; Druker, M., and NG, J. C. K. (2018). Direct and indirect influences of virus-insect vector-plant interactions on non-circulative, semipersistent virus transmission. *Curr. Opin. Plant Virol.* 33:129–136.