**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização biológica e molecular de um isolado do
Johnsongrass mosaic virus (JGMV) de *Panicum maximum* cv.
Mombaça em São Paulo**

Viviana Marcela Camelo García

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2014**

Viviana Marcela Camelo García
Engenheira Agrônoma

Caracterização biológica e molecular de um isolado do *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) de *Panicum maximum* cv. Mombaça em São Paulo

Orientador:
Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Camelo García, Viviana Marcela

Caracterização biológica e molecular de um isolado do *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) de *Panicum maximum* cv. Mombaça em São Paulo / Viviana Marcela Camelo García. - - Piracicaba, 2014.

69 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Potyvirus* 2. *Poaceae* 3. Genoma completo 4. Gama de hospedeiros I. Título

CDD 633.2
C181c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Blanca García e Jaime Camelo, pelo amor e incentivo, mesmo a
distância sempre estiveram presentes*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, pela excelente orientação, incentivo e amizade.

Ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitidos e contribuição na minha formação como pesquisadora.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP, em especial José Edivaldo Buriola e Pedro C. Arthuso pelo auxílio ao longo dos trabalhos, e Fabiana Nunes Wolak pelo apoio nos momentos necessários.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal, Ana Paula, Arnaldo, Carla, Carol, David, Débora, Júlio, Marina, Pedro, Rafael, Rodrigo, Tatiana e Vanessa por todo o apoio, amizade e pela convivência sempre agradável.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Fitopatologia, em especial a Dalilla, Daniela, Laura, Lillian, Sarah, Sergio, Thays e Ticyana, muito obrigada pela amizade, o dia a dia com vocês sempre foi mais fácil.

As amigas de casa Aline, Diana e Marina pela amizade, palavras de apoio e convivência agradável. E aos grandes amigos Adriana, Angela, Diego, Fausto, Javier, Julián, Miguel, Naty, Nelson, Ronald, Stalin e Silvia por todos os bons momentos compartilhados.

A minha família e amigos na Colômbia mesmo distantes sempre torceram por mim e contribuíram para que hoje eu estivesse aqui.

E finalmente agradeço a todas as pessoas que conheci durante o transcurso dessa etapa no Brasil, de uma ou outra forma fizeram que sempre me sentisse em casa.

Muito obrigada, de coração!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 Revisão bibliográfica	15
2.2 Material e Métodos.....	19
2.2.1 Local de execução	19
2.2.2 Isolado viral e inoculação mecânica	19
2.2.3 Purificação do vírus.....	20
2.2.4 Produção de antissoro	21
2.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	22
2.2.6 Gama de hospedeiros.....	22
2.2.7 PTA-ELISA	24
2.2.8 Determinação do peso molecular da proteína capsidial.....	25
2.2.9 Extração do RNA do vírus purificado.....	27
2.2.10 Reação de sequenciamento e análise.....	27
2.2.11 Detecção do JGMV por RT-PCR	30
2.2.11.1 Extração do RNA viral.....	30
2.2.11.2 Obtenção de oligonucleotídeos iniciadores e RT-PCR	31
2.2.11.3 Purificação do produto de PCR e sequenciamento de nucleotídeos	32
2.3 Resultados	33
2.3.1 Purificação do vírus e produção de antissoro.....	33
2.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
2.3.3 Gama de hospedeiros.....	34
2.3.4 Peso molecular da proteína capsidial	37
2.3.5 Sequenciamento do genoma completo do JGMV	38
2.3.6 Detecção do JGMV	44
2.4 Discussão	45
3 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES.....	61

RESUMO

Caracterização biológica e molecular de um isolado do *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) de *Panicum maximum* cv. Mombaça em São Paulo

Johnsongrass mosaic virus (JGMV) é uma espécie do gênero *Potyvirus*. A sua distribuição geográfica, até o início da década de 1990, estava limitada à Austrália e aos Estados Unidos, onde causa doença em sorgo, milho e várias gramíneas. Em 2001, o JGMV foi detectado pela primeira vez no Brasil em amostras de híbridos e variedades de milho provenientes da região de Ribeirão Preto, SP mediante análise sorológica (DAS-ELISA), e em 2013 foi detectado mediante RT-PCR em amostras de *Pennisetum purpureum* provenientes do Estado da Bahia. Em Fevereiro de 2012 a Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP recebeu amostras de *Panicum maximum* cv. Mombaça, com sintomas de mosaico, de São Luiz do Paraitinga, SP. Exames preliminares de contrastação negativa em microscópio eletrônico de transmissão indicaram a presença de partículas virais características de potyvirus. Diante disso, o principal objetivo deste trabalho foi caracterizar o agente etiológico associado às plantas doentes de capim Mombaça mediante testes biológicos, sorológicos e moleculares. Extratos foliares de plantas sintomáticas de capim Mombaça foram inoculados mecanicamente em 69 genótipos da família *Poaceae*. As avaliações foram feitas com base nos sintomas e por PTA-ELISA usando antissoro policlonal contra a proteína capsidial do potyvirus produzido nesse trabalho, após purificação do isolado viral. As espécies susceptíveis foram *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. plantaginea*, *Cenchrus echinatus*, *Echinochloa colona*, *E. crus-galli*, *E. crus-pavonis*, *Melinis minutiflora*, *Panicum maximum* cv. Colonião, *Pennisetum setosum*, *Rhynchelytrum repens*, *Rottboellia exaltata*, *Sorghum bicolor* BRS 332, *S. bicolor* BRS 509, *S. bicolor* x *S. sudanense* BRS 802 e *S. verticilliflorum*. Espécies cultivadas como arroz, aveia, cana-de-açúcar, centeio, milho e trigo não foram infectadas com esse isolado. O peso molecular da proteína capsidial deste potyvirus foi estimado em cerca de 33 kDa por meio de Western blot. Sequência de nucleotídeos do genoma completo (9.885 nt) obtida neste estudo revelou identidade de 82,03% com a única sequência completa do genoma de um isolado do JGMV da Austrália, depositada no GenBank. A partir dessa sequência foram obtidos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do isolado de SP do JGMV mediante RT-PCR.

Palavras-chave: *Potyvirus*; *Poaceae*; Genoma completo; Gama de hospedeiros

ABSTRACT

Biological and molecular characterization of an isolate of *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) of *Panicum maximum* cv. Mombaça in São Paulo

Johnsongrass mosaic virus (JGMV) is a species of the genus *Potyvirus*. The geographical distribution, until the early 1990s, was limited to Australia and the United States, where it causes disease in sorghum, corn and various grasses. In 2001, JGMV was first detected in Brazil in samples of hybrids and varieties of corn from the region of Ribeirão Preto, São Paulo State by serological analysis (DAS-ELISA), and in 2013 it was detected by RT-PCR in samples of *Pennisetum purpureum* from the State of Bahia. In February 2012, the Disease Diagnostic Clinic ESALQ/USP received samples of *Panicum maximum* cv. Mombaça, exhibiting mosaic symptoms, from the region of São Luiz do Paraitinga, SP. Preliminary examination of negatively stained sap in a transmission electron microscope indicated the presence of potyvirus-like particles. Therefore, the main objective of this study was to characterize the etiologic agent associated with *P. maximum* cv. Mombaça diseased plants by biological, serological and molecular tests. Leaf extract from Mombaça infected plants was mechanically inoculated in 69 genotypes of the *Poaceae* family. Evaluations were done based on symptoms expression and PTA-ELISA using polyclonal antiserum against the capsid protein of the potyvirus produced in the preset work virus purification. Susceptible species were *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. plantaginea*, *Cenchrus echinatus*, *Echinochloa colona*, *E. crus-galli*, *E. crus-pavonis*, *Melinis minutiflora*, *Panicum maximum* cv. Colonião, *Pennisetum setosum*, *Rhynchelytrum repens*, *Rottboellia exaltata*, *Sorghum bicolor* BRS 332, *S. bicolor* BRS 509, *S. bicolor* x *S. sudanense* BRS 802 and *S. verticilliflorum*. Cultivated species such as rice, oats, sugarcane, rye, corn and wheat were not infected with this isolate. The molecular weight of the coat protein of this potyvirus was estimated at about 33 kDa by Western blot. The nucleotide sequence of the complete genome (9885 nt) obtained in this study showed 82.03% identity with an unique sequence for the complete genome of an isolate of JGMV from Australia, deposited in GenBank. From this nucleotide sequence, specific pair of primers was designed for the detection of the São Paulo isolate of JGMV by RT-PCR.

Keywords: *Potyvirus*; *Poaceae*; Complete genome; Host range

1 INTRODUÇÃO

A família *Poaceae* compreende um número elevado de gêneros e espécies, que incluem arroz (*Oryza sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), centeio (*Secale cereale*), cevada (*Hordeum vulgare*), milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum* spp.). Também encontram-se várias espécies de gramíneas forrageiras pertencentes aos gêneros *Brachiaria*, *Panicum*, *Pennisetum*, entre outros. Esta família de gramíneas está entre as maiores de todas as famílias de plantas, consistindo em cerca de 700 gêneros e 10.000 espécies (LAPIERRE; SIGNORET, 2004).

No Brasil, a expansão da área cultivada com pastagens e a intensificação de seu uso trouxe como decorrência o aumento de doenças em plantas forrageiras. Estas doenças podem causar perdas em produtividade e qualidade das pastagens, assim como mortalidade de plantas. Atualmente, as doenças com maior impacto nos sistemas forrageiros são causadas pelos fungos: *Claviceps sulcata* que causa a mela-das-sementes de *Brachiaria* spp. e *Panicum maximum*; *Ustilago operta* agente causal do carvão da braquiária; *Puccinia levis* var. *panici-sanguinalis* que causa a ferrugem da braquiária; *Bipolaris maydis* agente causal da mancha foliar de *P. maximum*, *Brachiaria* sp., *Paspalum* sp. e *Pennisetum* sp.; *Tilletia ayresi* que causa a cárie-do-sino do *P. maximum*; *Colletotrichum gloeosporioides* associado à antracnose do *Stylosanthes* spp., e o complexo de fungos pertencentes aos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium* que, associados ou não ao fitonematoide *Pratylenchus* spp., causam a mortalidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (MARCHI; FERNANDES; VERZIGNASSI, 2011).

Outras doenças de menor impacto econômico têm sido registradas em plantas forrageiras como o brusone em *Brachiaria* spp. causado por *Magnaporthe grisea*; o mofo branco e a fusariose em *Stylosanthes* sp. causados por *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium chlamydosporum*, respectivamente. Não existe levantamento detalhado sobre as bactérias associadas às plantas forrageiras tropicais (MARCHI; FERNANDES; VERZIGNASSI, 2011).

A ocorrência de viroses em forrageiras é pouco relatada. Em cortes ultrafinos de tecido foliar de *P. maximum* cv. Mombaça apresentando mosaico foliar, em áreas experimentais e comerciais de forrageiras no estado do Mato Grosso do Sul, foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão inclusões citoplasmáticas típicas de potyvirus. Já em cortes ultrafinos de tecidos sintomáticos de *Stylosanthes*

guianensis cv. Mineirão, da mesma região, encontraram-se inclusões citoplasmáticas na forma de “agulhas”, sugerindo igualmente infecção viral por espécie ainda não identificada (SILVA et al., 2006). Em 2013, o potyvirus *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) foi relatado infectando *Pennisetum purpureum* no Estado da Bahia (SILVA et al., 2013).

Em Fevereiro de 2012 a Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP recebeu amostras de *P. maximum* cv. Mombaça com sintomas de mosaico, de São Luiz do Paraitinga, SP. Exames preliminares de contrastação negativa em microscópio eletrônico de transmissão indicaram a presença de partículas virais características do gênero *Potyvirus*. Diante disso, os principais objetivos deste trabalho foram caracterizar o agente etiológico associado às plantas doentes de capim Mombaça mediante testes biológicos, sorológicos e moleculares, e confirmar sua identidade mediante sequenciamento de nucleotídeos do genoma completo do vírus. Procurou-se também avaliar a suscetibilidade de diferentes espécies de poaceas produtoras de grãos e forrageiras à infecção com esse potyvirus por meio de inoculação mecânica.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

A família *Potyviridae* contém os vírus de plantas com RNA de fita simples senso positivo (ssRNA), genoma poliadenilado encapsidado em partículas alongadas e flexuosas. No nono relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus são reconhecidos sete gêneros (ADAMS et al., 2012), dos quais o maior em número de espécies é o gênero *Potyvirus*, contendo as mais importantes espécies de vírus de plantas, transmitidas por afídeos de maneira não-persistente (SHUKLA et al., 1998). Os outros gêneros desta família são classificados a partir das características genômicas e o tipo de vetor: *Ipomovirus* (3 espécies, transmissão por aleirodídeo), *Macluravirus* (3 espécies transmitidas por afídeos, partículas com tamanho inferior a 700 nm), *Rymovirus* (3 espécies restritas a *Poaceae* e transmitidas por ácaros do gênero *Abacarus*), *Tritimovirus* (3 espécies restritas a *Poaceae* e transmitidas por ácaros do gênero *Aceria*), *Bymovirus* (6 espécies restritas a *Poaceae*, genoma bipartido e transmitidas por *Polymyxa graminis*) e *Brambyvirus* (uma espécie, vetor ainda não identificado) (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; ADAMS et al., 2012).

Os membros do gênero *Potyvirus* tem partículas alongadas e flexuosas de 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro, o genoma possui cerca de 9,7 Kb (ADAMS et al., 2012; SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; SHUKLA et al., 1998). O genoma caracteriza-se por uma região 5' não traduzida (5' NTR), covalentemente ligada a uma proteína (VPg), uma única fase aberta de leitura ("Open Reading frame" - ORF) e uma região 3' não traduzida (3' NTR) terminando numa cauda poliadenilada (polyA) (Figura 1).

Figura 1 - Organização genômica do *Turnip mosaic virus* (TuMV), gênero *Potyvirus*. As duas linhas representam as regiões 5' e 3' não traduzidas. A caixa maior representa a fase aberta de leitura. As proteínas resultantes do processamento da poliproteína são indicadas nas caixas menores (WEI et al., 2010)

A única ORF codifica uma poliproteína precursora de 350 kDa que inclui três tipos de proteases que clivam a poliproteína em sítios específicos, gerando dez proteínas funcionais denominadas: P1, envolvida na replicação viral e tem um papel na determinação da gama de hospedeiros; HC-Pro (“helper component-protease”), importante na supressão do silenciamento gênico e na transmissão por afídeos; P3, envolvida na replicação viral, pode ser importante em determinar a gama de hospedeiros e no desenvolvimento de sintomas; 6K1, apresenta função desconhecida; CI (“cylindrical inclusion protein”) tem função de helicase e pode estar envolvida no movimento célula-a-célula; 6K2, tem função de ancorar o complexo replicativo às membranas da célula; VPg (“viral protein genome-linked”), é essencial para replicação e tradução do genoma do vírus, está envolvida na supressão do silenciamento gênico e é determinante de virulência; NIa-Pro, responsável pela clivagem da maioria dos sítios na poliproteína; NIb, função de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); CP é a proteína capsidial envolvida na transmissão por afídeos, movimento célula-a-célula e sistêmico e na montagem da partícula viral (ADAMS et al., 2012; ADAMS; ANTONIW; BEAUDOIN, 2005; SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; SHUKLA et al., 1998). Estudos recentes mostraram a presença de uma fase de leitura aberta adicional denominada PIPO (“pretty interesting potyvirus ORF”) localizada no interior do gene que codifica a proteína P3, denominada P3_PIPO. Ela é expressa mediante a estratégia de replicação de “frameshift”, sendo essencial no movimento intercelular do vírus (CHUNG et al., 2008; WEI et al., 2010).

O gênero *Potyvirus* possui 143 espécies reconhecidas e 32 espécies tentativas, *Potato virus Y* é a espécie tipo do gênero (ADAMS et al., 2012). Antes da sequência de nucleotídeos, espécies e estirpes foram distinguidas com dificuldade usando critérios tais como gama de hospedeiros, sintomatologia e sorologia. No entanto, a disponibilidade de sequências de nucleotídeos do gene que codifica a proteína capsidial (CP), e algumas vezes do genoma completo, tem ajudado a esclarecer a taxonomia e levou ao estabelecimento de critérios para demarcação de espécies e estirpes (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005). Os critérios definidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus para demarcação de espécies na família *Potyviridae* são: espécies diferentes tem identidade da sequência de aminoácidos da CP abaixo de 80%, e identidade da sequência de nucleotídeos do genoma completo ou do gene que codifica a CP inferior a 76%. Além disso, a gama de hospedeiros,

diferentes morfologias de inclusões citoplasmáticas e relacionamento sorológico pode ajudar a demarcar espécies (ADAMS et al., 2012).

Adams, Antoniw e Fauquet (2005) fizeram comparações para cada gene, para as regiões não traduzidas (NTRs) e para toda a ORF entre todos os potyvirus com os genomas completamente sequenciados. O estudo revelou que o gene CI é o melhor para diagnóstico e estudos de taxonomia quando somente uma porção do genoma é sequenciada, ao invés da sequência do gene CP geralmente usado para esse fim.

Entre as espécies do gênero *Potyvirus* que infectam gramíneas está o *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV). O primeiro relato desse vírus foi na Austrália, originalmente descrito como *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) (TAYLOR; PARES, 1968). Na Austrália, Teakle e Grylls (1973) baseados na gama de hospedeiros natural e experimental, sintomas em certas plantas diferenciais e propriedades antigênicas identificaram quatro estirpes do *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), designadas como Johnsongrass (JG), 'sugarcane' (SC), 'Queensland blue coach grass' (BC) e 'sabi grass' (Sabi). Em 1987, Shukla, Gough e Ward ao compararem a sequência completa de aminoácidos da proteína capsidial da estirpe JG do SCMV (303 aa) com as sequências das outras três estirpes australianas do SCMV e de outros potyvirus (263-267 aa) determinaram que a estirpe JG era uma espécie independente do gênero *Potyvirus* e não uma estirpe do SCMV. A nova espécie foi nomeada *Johnsongrass mosaic virus*.

Na atualidade, MDMV, SCMV, JGMV, *Sorghum mosaic virus* (SrMV), *Zea mosaic virus* (ZeMV) e *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) são classificados como espécies distintas. A nova taxonomia destes potyvirus foi baseada nas sequências de aminoácidos e perfis dos peptídeos da proteína capsidial, sorologia, reações dos cultivares diferenciais de sorgo e aveia, hibridação molecular com sondas correspondentes a região não codificada 3', e a morfologia e sorologia das inclusões cilíndricas citoplasmáticas (FAN et al., 2003; McKERN et al., 1990, 1991; SEIFERS et al., 2000; SHUKLA; GOUGH; WARD, 1987; SHUKLA; TEAKLE, 1989; SHUKLA et al., 1989, 1992; TOSIC et al., 1990).

A distribuição geográfica do JGMV, até o início da década de 1990, estava limitada à Austrália e aos Estados Unidos, onde causa doença em sorgo, milho e várias gramíneas (BRUNT et al., 1996; SHUKLA; TEAKLE, 1989). Em 1992, análises de microscopia eletrônica e sorologia (dupla difusão em ágar) revelaram que plantas

de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) com sintomas de mosaico na região de Maracay, Venezuela estavam infectadas com o JGMV. O vírus foi transmitido mecanicamente para capim Johnsongrass (*S. halepense*), aveia (*Avena sativa*) e alguns cultivares diferenciais de sorgo (GARRIDO; TRUJILLO, 1993). Posteriormente, na Colômbia a sequência de nucleotídeos de parte do gene da proteína capsidial de um potyvirus isolado de *Brachiaria* spp. revelou identidade de 88%, 89% e 92% com as sequências de nucleotídeos correspondentes do JGMV, estirpes MDO, MDKSI e JG, respectivamente, pelo qual foi designado como JGMV-Brac. Este isolado não infectou *S. halepense* (capim Johnsongrass) (MORALES et al., 1996; SEIFERS et al., 2005). Na Nigéria foi relatado um isolado do JGMV, obtido de sorgo, com distintas características sorológicas, biológicas e moleculares, as quais indicam que pode ser um isolado diferente do JGMV. Esse isolado, denominado JGMV-N infectou sorgo e outras gramíneas, mas não infectou aveia nem capim Johnsongrass (SEIFERS et al., 2005). Em 2001, o JGMV foi detectado pela primeira vez no Brasil em amostras de híbridos e variedades de milho provenientes da região de Ribeirão Preto, SP mediante análise sorológica (DAS-ELISA) (CHAVES et al., 2001). Em 2013, o JGMV foi detectado mediante RT-PCR em amostras de *Pennisetum purpureum* provenientes do Estado da Bahia. Sequência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial revelou identidade de 79% com um isolado do JGMV da Austrália depositado no GenBank (SILVA et al., 2013).

Na Austrália, os principais hospedeiros do JGMV são *S. halepense* (capim Johnsongrass) e *S. verticilliflorum* (sorgo silvestre), os quais desenvolvem mosaico e necrose na forma de anéis concêntricos. Essas plantas atuam como reservatórios perenes do vírus. Sorgos comerciais, tais como *S. alnum*, *S. bicolor* e *S. sudanense* quando infectados apresentam mosaico e lesões necróticas nas folhas e às vezes nanismo das plantas. Os principais sintomas do JGMV em milho são mosaico, manchas em forma de anéis e clorose nas folhas. Outros hospedeiros naturais do JGMV são: *Brachiaria miliiformis*, *B. praetervisa*, *Cenchrus ciliaris*, *Dinebra retroflexa*, *Echinochloa colona*, *E. crus-galli*, *E. frumentacea*, *Eragrostis cilianensis*, *Panicum miliaceum*, *Paspalum orbiculare*, *Pennisetum typhoideum*, *Setaria anceps*, *S. italica* e *S. verticillata*. Muitas outras gramíneas foram identificadas como suscetíveis ao JGMV após inoculação mecânica, mas algumas não apresentam sintomas. Até o momento, somente plantas da família *Poaceae* são suscetíveis ao JGMV (BRUNT et al., 1996; SHUKLA; TEAKLE, 1989).

O JGMV, como outros potyvirus, é transmitido por afídeos de forma não-persistente. As espécies de afídeos que transmitiram experimentalmente o vírus foram *Aphis craccivora*, *A. gossypii*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum maidis* (BRUNT et al., 1996; McDANIEL; GORDON, 1985; SHUKLA; TEAKLE, 1989; GARRIDO; TRUJILLO, 1993). *R. padi* e *Schizaphis graminum* não transmitiram uma estirpe do JGMV isolada de milho, denominada MDMV-O (McDANIEL; GORDON, 1985). As informações de transmissão deste vírus são antigas e restritas a estudos feitos com isolados da Austrália e dos Estados Unidos.

Em geral, existe grande carência de informações sobre medidas específicas de controle das doenças que afetam gramíneas forrageiras, o que confere maior importância às medidas de caráter preventivo, tais como: a diversificação das pastagens; o uso de cultivares com resistência às doenças, quando disponíveis; o uso de sementes tratadas; a escolha da época e da área para a semeadura; a manutenção do bom estado nutricional das plantas e o controle de plantas invasora. No caso de campos de multiplicação de sementes é importante o uso de fungicidas na parte aérea das plantas, porque é provável que os agentes causais de muitas doenças detectadas em forrageiras tropicais tenham sido disseminados mediante as sementes (MARCHI; FERNANDES; VERZIGNASSI, 2011).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Local de execução

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Virologia Vegetal e no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) em Piracicaba, SP.

2.2.2 Isolado viral e inoculação mecânica

Em fevereiro de 2012 a Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP recebeu amostras de *Panicum maximum* cv. Mombaça com sintomas de mosaico, de São Luiz do Paraitinga, SP. Exames preliminares de contrastação negativa em microscópio eletrônico de transmissão indicaram a presença de partículas virais

características de potyvirus. O isolado viral foi estabelecido em plantas de capim Mombaça em casa de vegetação na ESALQ/USP por meio de inoculação mecânica. O inóculo foi preparado em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio 0,02 M, na diluição 1:10. A inoculação foi feita friccionando nas folhas gaze contendo a suspensão viral e o abrasivo (carbureto de silício, grau 320). Nas plantas inoculadas foram observados os sintomas de mosaico típicos da doença, pelo qual estas plantas foram mantidas como fonte de inóculo. Esse inóculo foi renovado periodicamente através da transmissão mecânica para novas plantas de capim Mombaça.

2.2.3 Purificação do vírus

O vírus foi multiplicado em plantas de capim Mombaça mediante inoculação mecânica de extratos foliares de plantas sintomáticas. Folhas sintomáticas foram coletadas quatro semanas após a inoculação. A purificação do vírus foi feita a partir de 100 g de tecido foliar infectado seguindo o protocolo descrito por Duffus, Larsen e Liu (1986) estabelecido para purificar uma espécie do gênero *Closterovirus*, *Lettuce infectious yellows virus* a partir de plantas infectadas de *Nicotiana clevelandii*.

Inicialmente as folhas foram homogeneizadas em um liquidificador na presença de tampão de extração gelado na seguinte composição: Tris-HCl 0,1 M, acrescido de EDTA 5 mM, Na₂SO₄ 20 mM e DIECA 10 mM, pH 7,6. O extrato foliar foi filtrado em gaze para retirar as impurezas mais grosseiras e logo em seguida foi adicionado Triton X-100 na concentração de 4%. Deixou-se agitando durante a noite a 4°C. Seguiu-se centrifugação por 3 min a 3.000 rpm no rotor GSA - Sorval, em seguida por 10 min a 8.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi colocado sobre 5 ml de sacarose 30% diluída em tampão de extração gelado mais 4% de Triton X-100 e centrifugado por 3 h a 32.000 rpm (110.000g) no rotor T30 Beckman a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado gentilmente com água destilada e dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (Na₂HPO₄-KH₂PO₄), contendo EDTA 5 mM, Na₂SO₄ 20 mM e DIECA 10 mM, pH 7,0 (tampão A). Em seguida adicionou-se Triton X-100 na concentração de 4%. Deixou-se agitando durante a noite a 4°C. Seguiu-se centrifugação por 10 min a 8.000 rpm no rotor SS-34 Sorval a 4°C. O sobrenadante foi colocado sobre um colchão de 30% de sacarose preparada em tampão A com 4% de Triton X-100 e centrifugado por 2,5 h a 28.000 rpm (66.000g) no rotor T30

Beckman a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado gentilmente com água destilada e dissolvido em 4 ml de tampão fosfato 0,1 M, contendo EDTA 2 mM, pH 7,0 (tampão B). Deixou-se agitando por 5 h a 4°C. Seguiu-se centrifugação a 8.000 rpm no rotor SS-34 Sorval por 5 min, em seguida a 10.000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi misturado com Cs₂SO₄ na concentração de 25% (p/v) e colocado sobre colchão de 1 ml de Cs₂SO₄ 40% em tampão B. Seguiu-se centrifugação por 15 -18 h a 35.000 rpm (100.000g) em rotor Beckman SW 39 a 4°C. A banda resultante foi coletada e submetida à diálise em tampão B a 4°C. Com auxílio de uma seringa a suspensão viral purificada foi transferida da membrana de diálise a tubos de micro centrifuga de 1,5 ml e armazenada a 4°C.

A quantificação do vírus foi estimada usando-se a equação $C = (A_{260} \cdot d)/e$, onde C = concentração do vírus em mg/ml, A_{260} é absorvância de ácido nucleico no comprimento de onda de 260 nm medida em espectrofotômetro, d = fator de diluição da suspensão viral analisada em espectrofotômetro, e e = coeficiente de extinção do vírus. Como este não é conhecido, usou-se o coeficiente de extinção do *Potato virus Y* (PVY), espécie tipo do gênero *Potyvirus*, que é 2,8.

2.2.4 Produção de antissoro

A produção de antissoro policlonal foi feita injetando o vírus purificado em coelho. A imunização do coelho foi feita com quatro injeções musculares, sendo uma por semana. A concentração do vírus purificado foi 100 µg em cada injeção. Na primeira injeção o antígeno foi misturado com adjuvante completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis* + óleo mineral + agente emulsionante) na proporção de 1:1. Nas três injeções seguintes usou-se o adjuvante incompleto de Freund (óleo mineral + agente emulsionante), na mesma proporção. Em cada injeção foram utilizados 500 µl da mistura.

Uma semana após a última injeção foi realizada a coleta de 15 ml de sangue, o qual foi incubado a 4°C. A separação do soro sanguíneo foi feita centrifugando o sangue coagulado a 5.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado em tubos de micro centrifuga de 1,5 ml e armazenado a -20°C.

2.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Os trabalhos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram conduzidos no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP em Piracicaba, SP seguindo os protocolos descritos por Tanaka e Kitajima (2010).

A microscopia eletrônica de transmissão foi empregada inicialmente para a observação das partículas virais em folhas de capim Mombaça e para observar a qualidade das partículas virais do processo de purificação do JGMV. Para essas análises foi utilizada a técnica de contrastação negativa ('leaf dip'). Extrato de tecido vegetal, macerado em tampão fosfato 0,05 M contendo 0,01 M de sulfito de sódio, pH 7,0 ou suspensão viral purificada foram colocados em um pedaço de "parafilm". Sobre a gota foi depositada uma telinha de microscopia eletrônica de transmissão. Após 3 a 5 minutos, a telinha foi removida e lavada em água destilada, três vezes consecutiva. A contrastação foi feita com solução de acetato de uranila 1% durante 2 a 3 minutos. As telinhas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 do NAP/MEPA, ESALQ/USP.

Além disso, utilizou-se a MET para a visualizar as partículas virais de JGMV em tecido foliar de capim Mombaça com sintomas de mosaico. A preparação de amostras para técnicas de histologia ultraestrutural foi feita seguindo o protocolo de fixação, desidratação e emblocamento usado no NAP/MEPA (TANAKA; KITAJIMA, 2010). Os blocos foram desbastados usando o "Trimmer" da Leica. Os cortes ultrafinos (50 -100 nm) foram obtidos em ultramicrotomo Reicher, Ultracut E, com navalha de diamante Diatone. Em seguida foram colocados em telinhas de microscopia eletrônica, contrastando-se as secções em acetato de uranila 3% por 15 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos. As telinhas foram lavadas através de imersão (20 vezes) em água destilada, repetindo-se o procedimento 3 vezes consecutivas. As secções ultrafinas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 do NAP/MEPA, ESALQ/USP.

2.2.6 Gama de hospedeiros

Inicialmente, na casa de vegetação foram feitas sementeiras de espécies da família *Poaceae* (Tabela 1). Após germinação deixaram-se 4 plantas por vaso. As

plantas foram inoculadas mecanicamente aproximadamente um mês após a germinação. A inoculação foi repetida uma semana depois da primeira inoculação. Como controle da infectividade do isolado do JGMV foram inoculadas plantas de capim Mombaça. Como controle negativo foram inoculadas com tampão plantas sadias de cada espécie avaliada.

As avaliações das plantas inoculadas foram feitas mediante a observação de sintomas e por análise sorológica (PTA-ELISA) usando antissoro policlonal produzido nesse trabalho. Em alguns casos foi feita a recuperação biológica do JGMV inoculado em algumas espécies de *Poaceae*. Para isso foram inoculados mecanicamente extratos foliares obtidos das espécies inoculadas em plantas sadias de capim Mombaça.

Tabela 1 - Espécies de *Poaceae* inoculadas mecanicamente com o isolado de *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) de *Panicum maximum* cv. Mombaça

(continua)

Código	Nome científico	Nome comum
IAC5 ^d	<i>Avena sativa</i>	Aveia
BRABR-51 ^a	<i>Brachiaria brizantha</i>	Capim-braquiaraço
BRADC-13 ^a	<i>Brachiaria decumbens</i>	Capim-braquiária
BRADC-12 ^a	<i>Brachiaria plantaginea</i>	Capim-marmelada
BRARU-85 ^a	<i>Brachiaria ruziziensis</i>	Capim-braquiária-peluda
CCHEC-16 ^a	<i>Cenchrus echinatus</i>	Capim carrapicho
DIGHO-21 ^a	<i>Digitaria horizontalis</i>	Capim-colchão
DIGIN-22 ^a	<i>Digitaria insularis</i>	Capim-amargoso
ECHCO-25 ^a	<i>Echinochloa colona</i>	Capim-arroz
ECHCG-23 ^a	<i>Echinochloa crus-galli</i>	Capim-arroz
ECHCV-24 ^a	<i>Echinochloa crus-pavonis</i>	Capim-arroz
ELEIN-26 ^a	<i>Eleusine indica</i>	Capim-pé-de-galinha
ERAPI-87 ^a	<i>Eragrostis pilosa</i>	Capim-barbicha-de-alemão
BR2 ^d	<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada
LOLMU-83 ^a	<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém
MILMI-89 ^a	<i>Melinis minutiflora</i>	Capim-gordura
ORYSA-35 ^a	<i>Oryza sativa</i>	Arroz-preto
PANMA-36 ^a	<i>Panicum maximum</i>	Capim-colonião
ESALQ1 ^f	<i>Panicum maximum</i> cv. colonião	Capim-colonião
PESSE-57 ^a	<i>Pennisetum setosum</i>	Capim-custódio
RHYRE-41 ^a	<i>Rhynchelytrum repens</i>	Capim-favorito
ROOEX-64 ^a	<i>Rottboellia exaltata</i>	Capim-camalote
CTC2 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC2
CTC4 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC4
CTC9 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC9
CTC15 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC15
CTC17 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC17
CTC21 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC21
CTC24 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC24
BRSSerrano ^d	<i>Secale cereale</i>	Centeio
SETGE-53 ^a	<i>Setaria geniculata</i>	Capim-rabo-de-raposa
SORAR-77 ^a	<i>Sorghum arundinaceum</i>	Capim-falso-massambará
CTC-S1 ^b	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo granífero
201020110 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo vassoura
201020122 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo vassoura

Tabela 1 - Espécies de *Poaceae* inoculadas mecanicamente com o isolado de *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) de *Panicum maximum* cv. Mombaça

(conclusão)

Código	Nome científico	Nome comum
201020125 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo vassoura
BRS 310 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Híbrido granífero
BRS 330 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Híbrido granífero
BRS 332 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Híbrido granífero
BRS 501 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas
BRS 506 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas
BRS 508 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas
BRS 509 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas
BRS 511 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas
BRS 655 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Híbrido forrageiro
BRS 800 ^e	<i>Sorghum bicolor</i> x <i>S. sudanense</i>	Híbrido de corte e pastejo
BRS 802 ^e	<i>Sorghum bicolor</i> x <i>S. sudanense</i>	Híbrido de corte e pastejo
CTC-S2 ^b	<i>Sorghum bicolor</i> var. <i>sudanense</i>	Sorgo Sudão
EMBRAPA1 ^e	<i>Sorghum halepense</i>	Capim Johnsongrass
SORHA-67 ^a	<i>Sorghum halepense</i>	Capim Johnsongrass
ESALQ2 ^f	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo
ESALQ3 ^f	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo forrageiro
ESALQ4 ^f	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo granífero
ESALQ5 ^f	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo vassoura
CTC-S3 ^b	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo sacarino
CMSXS902 ^e	<i>Sorghum sudanense</i>	Linhagem de sorgo sudanense
TX2784 ^e	<i>Sorghum sudanense</i>	Linhagem de sorgo sudanense
TX2785 ^e	<i>Sorghum sudanense</i>	Linhagem de sorgo sudanense
EMBRAPA2 ^e	<i>Sorghum verticilliflorum</i>	Sorgo de alepo
CD108 ^d	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo
BRS203 ^d	<i>Triticum</i> spp. x <i>Secale cereale</i>	Triticale
2B710HR ^c	<i>Zea mays</i>	Transgênico contra lagarta
3OE35H ^c	<i>Zea mays</i>	Transgênico contra lagarta
WXA504 ^c	<i>Zea mays</i>	Não transgênico contra lagarta
DKB390YGRR2 ^c	<i>Zea mays</i>	Transgênico para herbicida
DKB390 ^c	<i>Zea mays</i>	Não transgênico para lagarta
AF428 ^c	<i>Zea mays</i>	Milho doce (Sakata)
Tropical plus ^c	<i>Zea mays</i>	Milho doce (Syngenta)
Pipoca ^c	<i>Zea mays</i>	Milho pipoca

a. Coleção de sementes proporcionada por Cosmos Agrícola Produção e Serviços Rurais Ltda.

b. Plantas e sementes proporcionadas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

c. Sementes proporcionadas pelo departamento de Genética da ESALQ/USP.

d. Sementes proporcionadas pelo laboratório de sementes do departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP.

e. Coleção de sementes proporcionada por Embrapa Milho e Sorgo.

f. Coleção de sementes do laboratório de virologia vegetal do departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP.

2.2.7 PTA-ELISA

Aproximadamente 20 dias depois da inoculação, amostras foliares das diferentes espécies de *Poaceae* inoculadas mecanicamente foram coletadas e avaliadas mediante o teste sorológico 'enzyme linked immunosorbent assay' (ELISA) do tipo 'plate-trapped antigen' (PTA) seguindo o protocolo descrito por Mowat e

Dawson (1987), com algumas modificações. Neste teste foi usado o antissoro policlonal contra a proteína capsidial do JGMV produzido nesse trabalho.

Inicialmente, as quatro plantas inoculadas de cada espécie foram analisadas conjuntamente. Caso a reação fosse positiva, cada uma das plantas foi avaliada individualmente. As amostras foliares foram maceradas em presença de tampão carbonato de sódio (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM e NaN_3 3 mM, pH 9,6) na diluição 1:50. Colocaram-se 100 μl de cada extrato por cavidade na placa de ELISA, de acordo com croqui previamente estabelecido. Foram usadas duas cavidades por amostra. Foram incluídos os controles negativo (extratos de plantas sadias de cada espécie avaliada) e positivo (extrato de capim Mombaça infectado com o JGMV). A placa foi incubada por 15 min a 37°C. Em seguida a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween (KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 140 mM, Na_2HPO_4 4 mM e KCl 3 mM, pH 7,4 acrescido de 0,5 ml de Tween 20). Depois, em cada cavidade foram colocados 100 μl de antissoro diluído 1:1000 em PBS-TPB (PBS-Tween, 2% de polyvinylpyrrolidone MW 44.000 e 0,2% de Bovine Serum Albumin). O antissoro contra o JGMV foi pré-absorvido com extrato foliar de planta sadia de capim Mombaça diluído 1:20 em PBS-TPB. A placa foi incubada por 2 h a 37°C e depois desse tempo foi lavada três vezes com PBS-Tween. Posteriormente, em cada cavidade foram colocados 100 μl de imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA Anti Rabbit IgG A-8025), diluída 1:34000 em PBS-TPB. A placa foi incubada por 2 h a 37°C e em seguida lavada três vezes com PBS-Tween. Finalmente, em cada cavidade foram colocados 100 μl de p-fosfato de nitrofenil (SIGMA 104-105) diluído em tampão de dietanolamina, numa concentração de 0,6 mg/ml. A placa foi incubada no escuro à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. A reação foi avaliada medindo a absorbância a 405 nm no leitor de ELISA Metertech Σ 960. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância foi superior a três vezes o valor médio da absorbância do extrato do respectivo controle negativo.

2.2.8 Determinação do peso molecular da proteína capsidial

A análise da proteína capsidial das plantas infectadas com o JGMV e do vírus purificado foi feita mediante o teste sorológico Western blot. Neste teste foi usado o antissoro policlonal contra a proteína capsidial do JGMV produzido nesse trabalho.

As proteínas totais das plantas infectadas com JGMV foram extraídas macerando num almofariz 0,25 g de folha em 200 µl de tampão TRIS 0,5 M, pH 6,8. O extrato foliar foi transferido a um tubo de micro centrifuga de 1,5 ml para uma centrifugação rápida. O sobrenadante foi coletado num tubo novo e misturado com igual volume de tampão de dissociação (TRIS 0,5 M, pH 6,8, SDS 3,8%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,1% e glicerol 19%). No caso do vírus purificado, 100 µl de suspensão viral foram misturados com um volume igual de tampão de dissociação. As proteínas foram desnaturadas através da incubação das amostras em água fervente por 5 min, seguida de centrifugação a 5.000 rpm por 5 min. Depois disso 10 µl de cada amostra foram carregados nos géis de poliacrilamida contendo SDS para a separação das proteínas. O marcador de proteínas 'Spectra™ multicolor low range protein ladder' foi usado para determinar o peso molecular. A corrida do gel foi feita numa cuba de eletroforeses vertical, usando tampão de corrida Laemmli 1X (TRIS 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%). A voltagem inicial na corrida foi de 95 volts por 20 min, permitindo a saída das amostras do gel de empilhamento para o gel de separação. Em seguida elevou-se a voltagem para 125 volts até as amostras alcançarem o fim do gel. Um gel foi corado com azul Coomassie para visualizar o perfil das proteínas extraídas. As proteínas de um segundo gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

A transferência foi feita no aparelho "Bio Rad Mini trans-blot cell" deixando o gel na direção do cátodo (-) e a membrana no ânodo (+), usando tampão de transferência (TRIS 0,3%, glicina 1,5% e metanol 20%). A corrida foi feita a 250 mA por 90 min. A membrana contendo as proteínas das amostras foi submetida a uma reação sorológica com antissoro contra a proteína capsidial do JGMV. Inicialmente a membrana foi lavada por 2 a 3 min com TBS/Tween (TRIS 0,002M, pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e Tween 20 0,05%) e incubada em TBS contendo 7,5% de leite em pó desnatado, por 60 min à temperatura ambiente, sob agitação lenta. A membrana foi transferida para uma solução com o antissoro diluído 1:1000 em TBS contendo 7,5% de leite em pó desnatado e incubada à temperatura ambiente por 4 h sob agitação lenta. Depois disso a membrana foi lavada três vezes em TBS/Tween, cada lavagem foi de 2 a 3 min sob agitação. Depois a membrana foi transferida para uma solução contendo imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-805), diluída 1:32.000 em TBS contendo 7,5% de leite em pó desnatado e incubada à temperatura ambiente por 4 h sob agitação lenta. Depois desse período a membrana

foi lavada três vezes em TBS/Tween, cada lavagem foi de 2 a 3 min sob agitação. Finalmente a membrana foi transferida para 10 ml de substrato [1 ml de tampão fosfatase alcalina 10X, 9 ml de água destilada, 25 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCPI) e 50 µl nitro blue tetrazolium (NBT)] e incubada à temperatura ambiente sob agitação lenta, para a reação enzimática. A reação foi interrompida lavando a membrana com água destilada. A avaliação foi visual.

2.2.9 Extração do RNA do vírus purificado

O RNA foi extraído do vírus purificado usando o kit Purelink® viral RNA/DNA (Invitrogen). Inicialmente, 200 µl do vírus purificado foram misturados com 25 µl de Proteinase K num tubo de micro centrifuga de 1,5 ml. Em seguida adicionaram-se 200 µl do 'Lysis Buffer' (contendo 5,6 µg do 'Carrier RNA'), a mistura foi agitada e incubada a 56°C por 15 min em banho-maria. Em seguida adicionaram-se 250 µl de etanol absoluto, agitou-se bem e incubou-se por 5 min a temperatura ambiente. Depois disso a mistura foi transferida para uma coluna 'Viral Spin Column' e centrifugada a 6.800 g por 1 min à temperatura ambiente. A coluna foi transferida a um novo tubo de micro centrifuga de 1,5 ml, recebeu 500 µl de 'Wash Buffer' com etanol absoluto e foi centrifugada a 6.800 g por 1 min à temperatura ambiente. Foram feitas duas lavagens com o 'Wash Buffer'. A coluna foi transferida a um novo tubo e foi centrifugada a 12.000 g por 1 min à temperatura ambiente para remover qualquer resíduo de 'Wash Buffer'. A coluna foi transferida a um novo tubo e no centro da coluna foram adicionados 50 µl de água livre de RNases. Após incubação por 1 min à temperatura ambiente a coluna foi centrifugada a 12.000 g por 1 min. A coluna foi descartada e o tubo contendo o RNA foi armazenado a -80°C até ser levado para sequenciamento de nucleotídeos no laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP em Piracicaba, SP. A qualidade do RNA extraído foi verificada usando o espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Scientific).

2.2.10 Reação de sequenciamento e análise

As bibliotecas foram preparadas por meio do TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 (Illumina), seguindo recomendações do fabricante. A primeira fita de cDNA foi

sintetizada a partir dos fragmentos de RNA viral utilizando hexâmeros randômicos e a enzima transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen). A síntese da segunda fita de cDNA foi realizada com as enzimas DNA polimerase I e RNase H. Após isso, as enzimas T4 DNA polimerase e Klenow DNA polimerase foram utilizadas para obtenção de extremidades abruptas nesse cDNA. A extremidade 3' da molécula foi fosforilada com a enzima T4 polynucleotidekinase (PNK), sendo, em seguida, realizada a adenilação nessa extremidade com a enzima Klenowexo. Posteriormente, foram ligados adaptadores com o uso da enzima T4 DNA Ligase para amplificação e sequenciamento do cDNA. As bibliotecas foram purificadas e amplificadas por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos complementares às sequências dos adaptadores.

A qualidade das bibliotecas foi avaliada com o equipamento Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies) usando o kit Agilent DNA 1000 (Agilent), a fim de verificar se o procedimento foi bem sucedido e se as amostras apresentavam a maior parte dos fragmentos próximo ao tamanho de 320 pb. Em seguida, as bibliotecas foram quantificadas individualmente por PCR em tempo real, utilizando o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems), logo foram desnaturadas e diluídas para 17 pM com o uso do kit TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina). As amostras diluídas foram clusterizadas na lâmina de sequenciamento, através do equipamento cBOT (Illumina).

O sequenciamento das bibliotecas foi realizado na plataforma HiSeq 2500 (Illumina), seguindo recomendações do fabricante. Foi feito sequenciamento paired-end 2x100 'reads' (duas leituras de 100 pb). As sequências dos fragmentos de cada 'cluster' foram determinadas com o kit TruSeq SBS kit v3-HS (Illumina), conforme as recomendações do fabricante. No final foram gerados cerca de 15 milhões de 'reads' por biblioteca.

Os dados obtidos pelo HiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA) foram analisados com ajuda da bioinformata Dra. Sônia Andrade, laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP em Piracicaba, SP. Na etapa de obtenção dos dados brutos foi utilizado o software CASAVA 1.8.2 fornecido pela Illumina, que faz o 'base call' dos dados brutos e os transforma em 'reads' no formato fastQ acompanhados dos phreds ('Phred Quality Score'). Os 'reads' single-end (SE) foram visualizados utilizando o programa FastQC www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/.

A filtragem dos 'reads' de baixa qualidade, sequências de adaptadores e vetores foi realizada pelo programa Seqyclean v.1.8.10 <https://bitbucket.org/izhbannikov/seqyclean>, utilizando como cutoff bases com qualidade inferior a 26QScore. A base de dados de contaminantes usada foi a Univec <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>. Após filtragem, 'reads' com comprimento inferior a 65pb foram removidos.

Os 'reads' que passaram pelo controle de qualidade foram utilizados na montagem utilizando o software VICUNA v. 1.3 (YANG et al., 2012). O tamanho de kmer foi de 15 pb, com span mínimo de 80 pb. Para juntar os contigs, o mínimo de similaridade entre as sequências foi 65%, com um tamanho máximo de possível ambiguidade de 30 pb em cada extremidade da sequência consenso. A porcentagem máxima permitida de divergência entre os 'reads' a serem adicionados à sequência consenso foi de 3%. No total, cerca de 3,5 milhões de 'reads' foram absorvidos à montagem em relação ao total de quase 3,7 milhões usados.

A identidade da sequência obtida foi definida usando BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) ferramenta disponibilizada pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) que permite a comparação com sequências depositadas no GenBank. A anotação de genes e os sítios de clivagem foram determinados manualmente baseando-se nos sítios de clivagem existentes para a família *Potyviridae* compilados por Adams, Antoniw e Beaudoin (2005) e disponíveis no banco de dados DPVweb (<http://www.dpvweb.net/potycleavage/>) (ADAMS, 2013).

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene que codifica a proteína capsidial obtidas neste estudo foram comparadas com as sequências correspondentes de isolados do JGMV descritos na Tabela 2. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos dos diferentes genes do isolado do potyvirus obtido do capim Mombaça, bem como as sequências de nucleotídeos das regiões 5' e 3' não traduzidas foram comparadas com as respectivas sequências disponíveis para um isolado do JGMV da Austrália (Nº de acesso NC003606). As sequências foram alinhadas usando o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As traduções das sequências de nucleotídeos para os aminoácidos deduzidos foram realizadas com a ferramenta Translate tool do site de ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<http://web.expasy.org/translate/>). A análise filogenética foi realizada usando o software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), utilizando-se o método estatístico de

'neighbor-joining' com bootstrap de 1.000 repetições. As distâncias evolutivas foram calculadas usando os métodos 'maximum composite likelihood' e número de diferenças (NEI; KUMAR, 2000; TAMURA; NEI; KUMAR, 2004). Como grupo externo foi usada a sequência de nucleotídeos de um isolado de *Potato virus Y* (Nº de acesso NC001616). Na análise filogenética das sequências de aminoácidos deduzidos inclui-se a sequência correspondente do *Nigerian sorghum potyvirus* isolado proveniente da Nigéria (Nº de acesso P83574), descrito por Seifers et al. (2005) como isolado JGMV-N.

Na análise de recombinação entre as sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial foram utilizados os métodos RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN e 3SEQ presentes no programa RDP3 (MARTIN et al., 2010).

Tabela 2 - Lista de isolados de *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) obtidos no GenBank e utilizados para análise filogenética e de recombinação com base na sequência do gene da proteína capsidial

Localidade	Nº de acesso				
Brasil	KC333416				
Austrália	AF032404,	AY387806,	AY387807,	AY387808,	AY387809,
	AY387810,	AY387811,	AY387812,	AY387813,	AY387814,
	AY387815,	AY387816,	AY387817,	AY387818,	AY387819,
	AY387820,	AY387821,	AY387822,	AY387823,	AY387824,
	AY387825, AY387826, AY387827, AY387828, NC003606, Z26920				
Estados Unidos	U07217, U07218				

2.2.11 Detecção do JGMV por RT-PCR

2.2.11.1 Extração do RNA viral

As extrações de RNA total de amostras de plantas infetadas com o JGMV foram realizadas seguindo o método de Toth et al. (2002), com algumas modificações. Para o controle negativo foi feita a extração de RNA total de uma planta sadia de capim Mombaça. Tecidos foliares de cada amostra foram macerados em almofariz (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2% e Na-DIECA 20 mM. Os extratos foram transferidos para tubos de micro centrifuga de 1,5 ml e centrifugados a 13.000 g por 10 min a 4°C. Posteriormente, 200 µl do sobrenadante

foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se 20 µl de SDS 10%. As misturas foram incubadas por 15 min a 55°C em banho-maria. Cem microlitros de solução de acetato de potássio a 3 M foram adicionados nas amostras, seguiu-se incubação por 5 min no gelo e centrifugação a 13.000 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, misturado com 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de uma solução contendo silício, incubado por 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 5.000 g por 1 min à temperatura ambiente. Os precipitados foram lavados duas vezes com 500 µl de solução de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto), seguido de centrifugação a 5.000 g por 1 min para cada lavagem. Secou-se o precipitado a vácuo e dissolveu-se em 400 µl de água Milli-Q tratada com dietilpirocabonato (DEPC) por incubação a 55°C por 5 min. Após centrifugação a 13.000 g por 5 min, 300 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e armazenados à -20°C.

2.2.11.2 Obtenção de oligonucleotídeos iniciadores e RT-PCR

A sequência do genoma completo do JGMV obtida neste estudo permitiu desenhar oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da proteína capsial desse vírus. Para isso foi usado a ferramenta Primer-BLAST disponibilizada pelo NCBI. Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados foram validados na detecção do JGMV mediante RT-PCR com RNA total extraído de plantas infectadas com esse vírus.

A RT-PCR One Step foi realizada em 25 µl, contendo 5 µl de RNA total extraído usando o método de Toth et al. (2002), 12,5 µl de 2X PCR Master mix (Fermentas), 0,4 µl de 100 mM oligonucleotídeo antisense, 0,4 µl de 100 mM oligonucleotídeo senso, 0,04 U/µl AMV transcriptase reversa (Promega) e 0,4 U/µl RNase inhibitor (Ambion). As condições do termociclador foram: um ciclo de 42°C por 30 min, um ciclo de 94°C por 3 min, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 45 s e 72°C por 45 s, e um ciclo de extensão final à 72°C por 10 min. Os amplicons foram analisados mediante eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e visualizados em transiluminador. O tamanho do amplicon foi determinado usando o marcador de peso 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Como controle positivo nas reações de RT-PCR foram usadas

amostras de plantas sabidamente infectadas com o JGMV e como controle negativo plantas sadias de capim Mombaça.

2.2.11.3 Purificação do produto de PCR e sequenciamento de nucleotídeos

Os amplicons do tamanho esperado obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados neste estudo foram purificados usando o kit PureLink® PCR purification (Invitrogen K3100-01). Inicialmente, 20 a 50 µl de produtos da RT-PCR foram misturados com 4 volumes do 'PureLink® Binding Buffer (B2)' com álcool isopropílico. Após agitar a mistura foi transferida para uma coluna 'PureLink® Spin Column' e centrifugada a 10.000 g por 1 min a temperatura ambiente. A coluna foi transferida a um novo tubo de micro centrifuga de 1,5 ml, recebeu 650 µl de 'Wash Buffer' com etanol absoluto e foi centrifugada a 10.000 g por 1 min à temperatura ambiente. A coluna foi transferida a um novo tubo e foi centrifugada a 12.000 g por 2 min à temperatura ambiente para remover qualquer resíduo de 'Wash Buffer'. A coluna foi transferida a um novo tubo e no centro da coluna foram adicionados 50 µl de 'Elution Buffer' (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Após incubação por 1 min à temperatura ambiente a coluna foi centrifugada a 12.000 g por 2 min. A coluna foi descartada e o tubo contendo o produto de PCR purificado foi armazenado à -20°C até ser enviado para sequenciamento de nucleotídeos na empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul).

As sequências obtidas foram editadas para obtenção do consenso e alinhadas usando os programas Electropherogram quality analysis (Embrapa) (<http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph/>) e ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As traduções das sequências de nucleotídeos para os aminoácidos deduzidos foram realizadas com a ferramenta Translate tool do site de ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<http://web.expasy.org/translate/>). A identidade das sequências obtidas foi definida usando BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) ferramenta disponibilizada pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) que permite a comparação com sequências depositadas no GenBank.

2.3 Resultados

2.3.1 Purificação do vírus e produção de antissoro

O processo de purificação do isolado do JGMV de capim Mombaça foi realizado com sucesso, obtendo uma suspensão de boa qualidade de vírus purificado. A análise ao espectrofotômetro da suspensão viral é apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Espectro de absorvância de UV da suspensão viral do isolado do JGMV

Usando-se o coeficiente de extinção do *Potato virus Y* (2,86) e $A_{260} = 0,646$, com suspensão diluída 1:20, obteve-se a concentração aproximada de 4,517 miligramas de partículas virais por mililitro da solução purificada. A qualidade do vírus purificado foi avaliada com auxílio do microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 (Figura 3). Observou-se as partículas virais integras e em alta concentração. O vírus purificado foi armazenado em freezer -20°C .

O vírus purificado foi usado para produzir antissoro. No coelho foi obtido soro sanguíneo contendo anticorpos policlonais contra o JGMV para posterior utilização em testes sorológicos. O antissoro foi armazenado em freezer -20°C .

Figura 3 - Micrografia eletrônica do potyvirus purificado a partir de folhas de capim Mombaça com sintomas de mosaico foliar. Barra = 200 nm

2.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultraestrutural de tecidos foliares de capim Mombaça infectado com o JGMV confirmaram a presença de partículas virais alongadas e flexuosas características do gênero potyvirus (Figura 4).

Figura 4 - Micrografia eletrônica do *Johnsongrass mosaic virus* em folhas de capim Mombaça com sintomas de mosaico foliar. Barra = 200 nm

2.3.3 Gama de hospedeiros

Os resultados da reação de 69 genótipos, representando 21 gêneros da família *Poaceae* inoculadas mecanicamente com extratos foliares de plantas sintomáticas

de capim Mombaça são apresentados na Tabela 3. Plantas de algumas espécies apresentaram sintomas típicos de infecção viral, como mosaico e redução do crescimento (Figura 5). Dezesesseis dos sessenta e nove genótipos avaliados foram infectados com o isolado do JGMV, cuja infecção foi confirmada no teste sorológico de PTA-ELISA. As espécies susceptíveis foram: *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. plantaginea*, *Cenchrus echinatus*, *Echinochloa colona*, *E. crus-galli*, *E. crus-pavonis*, *Melinis minutiflora*, *Panicum maximum* cv. Colonião, *Pennisetum setosum*, *Rhynchelytrum repens*, *Rottboellia exaltata*, *Sorghum bicolor* BRS 332, *S. bicolor* BRS 509, *S. bicolor* x *S. sudanense* BRS 802 e *S. verticilliflorum*. Em todas as inoculações todas as plantas de capim Mombaça, usadas como controle da infectividade do inóculo, foram infectadas e o vírus detectado por PTA-ELISA.

Adicionalmente foi feita a recuperação biológica do JGMV inoculado nas plantas de milho 2B710HR, 3OE35H, DKB390 e milho doce (Sakata), e nas plantas de sorgo SORHA-67, pois havia suspeita de infecção. O resultado de recuperação biológica foi negativo.

Tabela 3 - Reação de diferentes genótipos de *Poaceae* inoculados mecanicamente com o isolado do *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) de *Panicum maximum* cv. Mombaça. Avaliação por sintomas e PTA-ELISA

(continua)			
Código	Nome científico	Nome comum	Plantas infectadas/ Plantas inoculadas
IAC5 ^d	<i>Avena sativa</i>	Aveia	0/4
BRABR-51 ^a	<i>Brachiaria brizantha</i>	Capim-braquiarão	1/4
BRADC-13 ^a	<i>Brachiaria decumbens</i>	Capim-braquiária	3/4
BRADC-12 ^a	<i>Brachiaria plantaginea</i>	Capim-marmelada	4/4
BRARU-85 ^a	<i>Brachiaria ruziziensis</i>	Capim-braquiária-peluda	0/4
CCHEC-16 ^a	<i>Cenchrus echinatus</i>	Capim carrapicho	1/4
DIGHO-21 ^a	<i>Digitaria horizontalis</i>	Capim-colchão	0/4
DIGIN-22 ^a	<i>Digitaria insularis</i>	Capim-amargoso	0/4
ECHCO-25 ^a	<i>Echinochloa colona</i>	Capim-arroz	8/8
ECHCG-23 ^a	<i>Echinochloa crus-galli</i>	Capim-arroz	1/4
ECHCV-24 ^a	<i>Echinochloa crus-pavonis</i>	Capim-arroz	4/4
ELEIN-26 ^a	<i>Eleusine indica</i>	Capim-pé-de-galinha	0/4
ERAPI-87 ^a	<i>Eragrostis pilosa</i>	Capim-barbicha-de-alemão	0/4
BR2 ^d	<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada	0/8
LOLMU-83 ^a	<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém	0/4
MILMI-89 ^a	<i>Melinis minutiflora</i>	Capim-gordura	4/4
ORYSA-35 ^a	<i>Oryza sativa</i>	Arroz-preto	0/4
PANMA-36 ^a	<i>Panicum maximum</i>	Capim-colonião	0/4
ESALQ1 ^f	<i>Panicum maximum</i> cv. colonião	Capim-colonião	4/8
PESSE-57 ^a	<i>Pennisetum setosum</i>	Capim-custódio	2/3
RHYRE-41 ^a	<i>Rhynchelytrum repens</i>	Capim-favorito	0/4
ROOEX-64 ^a	<i>Rottboellia exaltata</i>	Capim-camalote	3/4
CTC2 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC2	0/4
CTC4 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC4	0/8
CTC9 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC9	0/4

Tabela 3 - Reação de diferentes genótipos de *Poaceae* inoculados mecanicamente com o isolado do *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) de *Panicum maximum* cv. Mombaça. Avaliação por sintomas e PTA-ELISA

Código	Nome científico	Nome comum	(conclusão)
			Plantas infectadas/ Plantas inoculadas
CTC15 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC15	0/4
CTC17 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC17	0/4
CTC21 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC21	0/4
CTC24 ^b	<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar CTC24	0/4
BRSSerrano ^d	<i>Secale cereale</i>	Centeio	0/8
SETGE-53 ^a	<i>Setaria geniculata</i>	Capim-rabo-de-raposa	0/4
SORAR-77 ^a	<i>Sorghum arundinaceum</i>	Capim-falso-massambará	0/5
CTC-S1 ^b	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo granífero	0/4
201020110 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo vassoura	0/4
201020122 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo vassoura	0/4
201020125 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo vassoura	0/4
BRS 310 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Híbrido granífero	0/4
BRS 330 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Híbrido granífero	0/4
BRS 332 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Híbrido granífero	1/4
BRS 501 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas	0/4
BRS 506 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas	0/4
BRS 508 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas	0/4
BRS 509 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas	1/4
BRS 511 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Variedades sacarinas	0/4
BRS 655 ^e	<i>Sorghum bicolor</i>	Híbrido forrageiro	0/4
BRS 800 ^e	<i>Sorghum bicolor</i> x <i>S. sudanense</i>	Híbrido de corte e pastejo	0/8
BRS 802 ^e	<i>Sorghum bicolor</i> x <i>S. sudanense</i>	Híbrido de corte e pastejo	2/8
CTC-S2 ^b	<i>Sorghum bicolor</i> var. <i>sudanense</i>	Sorgo Sudão	0/4
EMBRAPA1 ^e	<i>Sorghum halepense</i>	Capim Johnsongrass	0/8
SORHA-67 ^a	<i>Sorghum halepense</i>	Capim Johnsongrass	0/12
ESALQ2 ^f	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo	0/8
ESALQ3 ^f	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo forrageiro	0/8
ESALQ4 ^f	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo granífero	0/8
ESALQ5 ^f	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo vassoura	0/8
CTC-S3 ^b	<i>Sorghum</i> spp.	Sorgo sacarino	0/4
CMSXS902 ^e	<i>Sorghum sudanense</i>	Linhagem de sorgo sudanense	0/4
TX2784 ^e	<i>Sorghum sudanense</i>	Linhagem de sorgo sudanense	0/4
TX2785 ^e	<i>Sorghum sudanense</i>	Linhagem de sorgo sudanense	0/4
EMBRAPA2 ^e	<i>Sorghum verticilliflorum</i>	Sorgo de alepo	8/8
CD108 ^d	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	0/8
BRS203 ^d	<i>Triticum</i> spp. x <i>Secale cereale</i>	Triticale	0/8
2B710HR ^c	<i>Zea mays</i>	Transgênico contra lagarta	0/8
3OE35H ^c	<i>Zea mays</i>	Transgênico contra lagarta	0/8
WXA504 ^c	<i>Zea mays</i>	Não transgênico contra lagarta	0/8
DKB390YGRR2 ^c	<i>Zea mays</i>	Transgênico para herbicida	0/8
DKB390 ^c	<i>Zea mays</i>	Não transgênico para lagarta	0/8
AF428 ^c	<i>Zea mays</i>	Milho doce (Sakata)	0/8
Tropical plus ^c	<i>Zea mays</i>	Milho doce (Syngenta)	0/8
Pipoca ^c	<i>Zea mays</i>	Milho pipoca	0/8
TOTAL			47/380

Figura 5 - Sintomas em algumas espécies de *Poaceae* infectadas com o JGMV. A. *Brachiaria decumbens*. B. *Brachiaria plantaginea*. C. *Cenchrus echinatus*. D. *Echinochloa crus-galli*. E. *Panicum maximum* cv. Mombaça. F. *Rhynchoselytrum repens*. G. Redução de crescimento em plantas de *R. repens* infectadas (esquerda), comparadas com plantas sadias (direita). H. Folhas de capim Mombaça infectado (esquerda) e sadio (direita)

2.3.4 Peso molecular da proteína capsial

O peso molecular da proteína capsial do JGMV extraído de plantas infectadas e do vírus purificado foi estimado em cerca de 33 kDa, típico da proteína capsial desse potyvirus (Figura 6A). Shukla, Gough e Ward (1987) determinaram o peso

molecular da proteína capsial desse vírus em 33.510 daltons. As proteínas transferidas na membrana de nitrocelulose reagiram com o antissoro policlonal contra JGMV, confirmando sua identidade (Figura 6B).

Figura 6 - Análise da proteína capsial em teste sorológico de Western blot usando antissoro policlonal contra o JGMV. A. Perfil de proteínas em gel SDS-PAGE 12,5% corado com azul Coomassie. B. Membrana de nitrocelulose após reação sorológica com o antissoro policlonal contra o JGMV. MP: Marcador de peso molecular de proteínas 'Spectra™ multicolor low range protein ladder'. 1, 2: Vírus purificado. 3: Extrato de *Rhynchelytrum repens* infectado. 4: Extrato de capim Mombaça infectado. 5: Extrato de capim Mombaça sadio

2.3.5 Sequenciamento do genoma completo do JGMV

O espectro de absorvância de 1 µl do RNA extraído a partir do vírus purificado é apresentado na Figura 7. As razões das absorvâncias 260/280 e 260/230 foram 2,12 e 2,38, respectivamente, as quais indicam uma alta pureza do RNA e ausência de contaminantes de proteína, uma vez que esses valores estão próximos a 2,0. A concentração de ácido nucleico foi estimada em 228,3 ng/µl.

Figura 7 - Espectro de absorvância de UV do RNA extraído a partir do vírus purificado

O sequenciamento do RNA extraído a partir do vírus purificado gerou aproximadamente 3,7 milhões de 'reads', os quais foram usados para a montagem da sequência consenso do genoma completo do JGMV. A sequência do genoma do JGMV isolado de capim Mombaça consiste de 9.885 nucleotídeos, excluindo a cauda poli-A na extremidade 3' (Figura 8, Apêndice A). O códon AUG localizado na posição 236-238 nt provavelmente é o códon de iniciação da tradução. O possível códon de finalização (UAA) foi localizado na posição 9.410-9.412 nt. A fase aberta de leitura (ORF) codifica uma poliproteína de 3.058 aminoácidos. A ORF está limitada por uma região 5' não traduzida de 235 nucleotídeos e uma região 3' não traduzida de 476 nucleotídeos.

Na Tabela 4 é apresentada comparação da organização do genoma do JGMV desse estudo com a do único isolado completamente sequenciado da Austrália (GOUGH; SHUKLA, 1993).

Figura 8 - Organização genômica do isolado do *Johnsongrass mosaic virus* de capim Mombaça. As duas linhas nas extremidades representam as regiões 5' e 3' não traduzidas. A caixa maior representa a fase aberta de leitura. As proteínas resultantes do processamento da poliproteína são indicadas nas caixas menores. Os números acima do genoma indicam o início de cada gene, os prováveis sítios de clivagem são indicados na parte inferior

Tabela 4 - Comparação da organização do genoma do *Johnsongrass mosaic virus* isolado de capim Mombaça com a do isolado da Austrália (N° de acesso NC003606)

Proteína	JGMV - Capim Mombaça		JGMV - Austrália	
	Aminoácidos	Nucleotídeos	Aminoácidos	Nucleotídeos
P1	1 - 237	236 - 946	1 - 237	149 - 859
HC-Pro	238 - 698	947 - 2.329	238 - 698	860 - 2.242
P3	699 - 1.045	2.330 - 3.370	699 - 1.045	2.243 - 3.283
6K1	1.046 - 1.097	3.371 - 3.526	1.046 - 1.097	3.284 - 3.439
CI	1.098 - 1.750	3.527 - 5.485	1.098 - 1.749	3.440 - 5.395
6K2	1.751 - 1.803	5.486 - 5.644	1.750 - 1.802	5.396 - 5.554
VPg	1.804 - 1.992	5.645 - 6.211	1.803 - 1.991	5.555 - 6.121
Nla-Pro	1.993 - 2.233	6.212 - 6.934	1.992 - 2.232	6.122 - 6.844
Nlb	2.234 - 2.750	6.935 - 8.485	2.233 - 2.749	6.845 - 8.395
CP	2.751 - 3.058	8.486 - 9.409	2.750 - 3.052	8.396 - 9.304

De acordo com os sítios conservados de clivagem previstos por Adams, Antoniw e Beaudoin (2005), um total de 10 proteínas são esperadas: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, Nla-Pro, Nlb e CP. A fase de leitura aberta adicional denominada PIPO foi encontrada entre os nucleotídeos 2.797 e 3.066. Os sítios de clivagem são apresentados na Figura 8, Tabela 5 e Apêndice A. Nessa tabela os sítios de clivagem na poliproteína do isolado do JGMV desse estudo são comparados com os respectivos sítios de clivagem da poliproteína do isolado do JGMV da Austrália (N° de acesso NC003606).

Tabela 5 - Prováveis sítios de clivagem da poliproteína do *Johnsongrass mosaic virus* isolado de capim Mombaça comparados com os do isolado da Austrália (N° de acesso NC003606)

Proteína	JGMV - Capim Mombaça	JGMV - Austrália
P1/HC-Pro	^a KQIKHY S	KQICHY S
HC-Pro/P3	KEYIVG G	KEYIVG G
P3/6K1	TEVEHE R	TEVEHE R
6K1/CI	QEVKHE G	QEVKHE G
CI/6K2	QTVIHE N	QTVIHE N
6K2/VPg	TEVEHE G	TEVEHE G
VPg/Nla-Pro	PEVEHE G	PEVEHE G
Nla-Pro/Nlb	ERVSNE S	ERISNE S
Nlb/CP	VDVEHQ S	VDVEHQ S

a. As posições dos aminoácidos são identificadas por P6, P5, P4, P3, P2, P1 / P1', a partir da esquerda, conforme proposto por Adams, Antoniw e Beaudoin (2005)

As sequências completas de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos da poliproteína do isolado do JGMV de capim Mombaça apresentaram 82,03% e 91,06% de identidade, respectivamente com as sequências correspondentes de um único isolado desse vírus, da Austrália, depositado no GenBank (N° de acesso NC003606) (Tabela 6). Nessa mesma tabela são apresentadas as identidades de

nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos dos diferentes genes do isolado do JGMV desse trabalho, quando comparados com os respectivos genes do isolado do JGMV da Austrália. As menores porcentagens de identidade foram encontradas para o gene que codifica a proteína P1, ou sejam 72,29% e 74,26%, respectivamente.

A análise de recombinação utilizando-se somente sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de 29 isolados do JGMV disponíveis no GenBank não revelaram qualquer evento de recombinação através de 7 métodos independentes de análise do programa RDP3.

Tabela 6 - Comparações das porcentagens de identidades de sequências de nucleotídeos (nt) e de aminoácidos deduzidos (aa) entre o isolado do *Johnsongrass mosaic virus* obtido neste estudo e o da Austrália (N° de acesso NC003606)

Região do genoma	Identidade (%)	
	nt	aa
Genoma completo	82,03	-
Poliproteína	-	91,06
5' NTR	76,19	-
P1	72,29	74,26
HC-Pro	77,44	88,50
P3	84,44	91,07
PIPO	89,63	82,02
6K1	86,54	98,08
CI	84,10	96,78
6K2	86,16	96,23
VPg	81,66	92,06
NIa-Pro	84,37	95,44
NIb	84,20	96,52
CP	80,97	80,20
3' NTR	80,20	-

Devido ao fato de haver somente uma sequência de nucleotídeos do genoma completo do JGMV disponível no GenBank, a análise filogenética foi feita com as 29 sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene que codifica a proteína capsidial dos isolados do JGMV listados na Tabela 2, usando como grupo externo o *Potato virus Y*. A partir das sequências de nucleotídeos (Figura 9) e de aminoácidos deduzidos (Figura 10) foram construídas as árvores filogenéticas.

Figura 9 - Árvore filogenética construída com as sequências de nucleotídeos do gene da proteína capsial do isolado do JGMV obtido neste estudo e de outros isolados do JGMV. A análise foi feita usando o software MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). As sequências foram alinhadas usando ClustalW2 e a árvore filogenética foi construída usando o método de 'neighbor-joining' com bootstrap de 1.000 repetições. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método 'maximum composite likelihood' (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004)

Figura 10 - Árvore filogenética construída com as sequências de aminoácidos deduzidos da proteína capsidial do isolado do JGMV obtido neste estudo e de outros isolados do JGMV. A análise foi feita usando o software MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). As sequências foram alinhadas usando ClustalW2 e a árvore filogenética foi inferida usando o método estatístico de 'neighbor-joining' com bootstrap de 1.000 repetições. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método número de diferenças (NEY, KUMAR, 2000)

Em ambas as árvores nota-se claramente que os isolados do JGMV da Austrália agruparam-se com os dois isolados desse vírus dos EUA; enquanto o isolado do JGMV desse estudo agrupou-se com outro isolado brasileiro desse vírus obtido de *Pennisetum purpureum* no Estado da Bahia relatado por Silva et al. (2013).

2.3.6 Detecção do JGMV

A partir da sequência do genoma completo do JGMV foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores denominados JGMV-CPF (5'-CAAAGCCCCATACTTGTCGG-3') e JGMV-CPR (5'-TCAGACTTGGTCAGTCATCC-3'), que flanqueiam as posições 8.343-8.363nt no gene NIb e 9.444-9.464 nt na região 3' não traduzida. Amplificam um fragmento de 1.121 pb que contém o gene completo da proteína capsial.

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores JGMV-CPF e JGMV-CPR na análise por RT-PCR foi testada usando RNA total extraído de capim Mombaça infectado com JGMV e cana-de-açúcar infectada com o potyvirus *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). Na Figura 11 pode-se ver que apenas RNA totais extraídos de plantas infectadas com JGMV (linhas 1 a 5) foram amplificados por RT-PCR. A sequência de nucleotídeos desses amplicons (924 nt) revelaram identidades de 83 a 95% com sequências de nucleotídeos correspondentes de diferentes isolados do JGMV depositadas no GenBank. Quando comparadas com a sequência correspondente do isolado brasileiro relatado por Silva et al. (2013) a identidade foi de 95%, e a do presente trabalho foi de 100%.

Figura 11 - Detecção do *Johnsongrass mosaic virus* mediante RT-PCR. Produto de PCR esperado de 1.121 pb. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA (Invitrogen). Espécies inoculadas com JGMV: (1) *Sorghum bicolor* x *S. sudanense* BRS 802, (2) *S. bicolor* BRS 509, (3) *Echinochloa colona*, (4) *S. verticilliflorum*, (5) Capim Mombaça e (6) Capim Johnsongrass. (7) Capim Mombaça sadio. (8) Cana-de-açúcar infectada com SCMV

Neste estudo foram testados outros oligonucleotídeos universais para o gênero *Potyvirus* descritos na literatura (Tabela 7), porém os resultados não foram conclusivos devido a presença de amplificações inespecíficas (Figura 12). Os oligonucleotídeos universais PV1 e WCIEN são altamente usados na detecção de potyvirus, porém não foi possível amplificar o fragmento do genoma viral do isolado do JGMV deste estudo.

Tabela 7 - Oligonucleotídeos universais para o gênero *Potyvirus* avaliados para detecção do JGMV

Primers	Sequência (5' – 3')	Referência
PV1	T ₁₇ V	Gibbs e Mackenzie (1997)
WCIEN(P1)	ATGGTTTGGTGYATYGARAAT	Mota et al. (2004)
Sprimer; PY11	GGNAAYAAAYAGYGGNCARCC	Chen, Chen e Adams, (2001); Silva et al. (2013)
M10	AAGCAGTGTATCAACGCAGA	Silva et al. (2013)
JGMV-F	AGTGGGCAGCCATCAACAGTCG	Neste estudo

Figura 12 - Detecção do *Johnsongrass mosaic virus* mediante RT-PCR. Produto PCR esperado de ~1,6 Kb. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA (Invitrogen). 1,2 4 e 5: Capim Mombaça infectado com JGMV. 3 e 6: Capim Mombaça sadio

2.4 Discussão

O agente etiológico associado às plantas doentes de *Panicum maximum* cv. Mombaça provenientes de São Luiz do Paraitinga, SP foi caracterizado mediante testes biológicos, sorológicos e moleculares, e sua identidade foi confirmada mediante sequenciamento de nucleotídeos do genoma completo. Os resultados indicaram que se trata da espécie de potyvirus *Johnsongrass mosaic virus*. Este

vírus ocorre na Austrália, Colômbia, Nigéria, Estados Unidos e Venezuela (GARRIDO; TRUJILLO, 1993; McDANIEL; GORDON, 1985; MORALES et al., 1996; SEIFERS et al., 2005; SHUKLA; TEAKLE, 1989; TAYLOR; PARES, 1968), e também já havia sido relatado no Brasil (CHAVES, et al., 2001; SILVA et al., 2013).

A sequência de nucleotídeos do genoma completo do isolado do JGMV desse estudo revelou 82,03% de identidade com a única sequência completa disponível no Genbank, correspondente a um isolado do JGMV australiano relatado por Gough e Shukla (1993). Ao comparar as sequências de nucleotídeos do gene que codifica a proteína capsidial (924 nt) e de aminoácidos deduzidos (308 aa) constatou-se identidades variáveis de 78,44 a 95,45% e de 76,9 a 95,45%, respectivamente com as sequências correspondentes desse gene de diversos isolados do JGMV disponíveis no GenBank. A maior identidade (95,45%) obteve-se com a sequência de nucleotídeos do isolado brasileiro relatado por Silva et al. (2013). Segundo os atuais critérios do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus para demarcação de espécies no gênero *Potyvirus*, identidades da sequência de aminoácidos deduzidos da proteína capsidial inferiores a 80% e identidades da sequência de nucleotídeos do gene que codifica essa proteína ou da sequência completa do genoma inferiores a 76% indicam espécies distintas (ADAMS et al., 2012). Baseando-se nisso, o isolado do potyvirus desse estudo é uma estirpe da espécie JGMV.

A comparação da sequência de aminoácidos deduzidos da poliproteína do isolado de JGMV desse trabalho com as sequências correspondentes de outros membros do gênero *Potyvirus* permitiu identificar os sítios de clivagem das diferentes proteínas. Os prováveis sítios de autoclivagem da proteína P1 (P1/HC-Pro) e HC-Pro (HC-Pro/P3) são idênticos aos encontrados para muitos potyvirus (Tabela 5), isto é tirosina/serina (Y/S) e glicina/glicina (G/G), respectivamente (ADAMS; ANTONIW; BEAUDOIN, 2005). Os aminoácidos das posições P1 - P6 próximos aos possíveis sítios de clivagem das proteínas P3/6K1, 6K1/CI, CI/6K2, 6K2/VPg, VPg/Nla-Pro e NIb/CP também são idênticos aos descritos para o isolado do JGMV da Austrália (Tabela 5). O aminoácido na posição P3 da região de clivagem Nla-Pro/NIb é valina (V) em vez de isoleucina (I) como ocorre no isolado australiano desse potyvirus. Esta comparação também revelou que o genoma do isolado de JGMV deste estudo tem uma organização similar à de outros potyvirus.

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos dos diferentes genes do isolado do JGMV desse trabalho foram comparados com as respectivas

sequências dos genes do isolado do JGMV da Austrália (Tabela 6). As menores porcentagens de identidade de aminoácidos foram encontradas para os genes que codificam as proteínas P1, CP e PIPO enquanto as maiores porcentagens de identidade de aminoácidos foram para os genes que codificam as proteínas 6K1, CI e NIb. Gough e Shukla (1993) ao compararem as sequências de aminoácidos deduzidos das proteínas codificadas pelos diferentes genes do isolado do JGMV da Austrália com as sequências correspondentes do genoma de outra espécie de potyvirus, o *Tobacco etch virus*, constataram que as proteínas P1 e P3 foram as mais variáveis, e as proteínas NIb e CP foram as mais conservadas. Adams, Antoniw e Fauquet (2005) fizeram comparações para cada gene, para as regiões não traduzidas (NTRs) e para a completa fase aberta de leitura (ORF) entre todos os vírus totalmente sequenciados da família *Potyviridae*. Usando os dados de identidade de nucleotídeos encontraram que os genes que codificam as proteínas P1 e P3 mostraram a maior variabilidade, e os genes que codificam as proteínas CI e HC-Pro foram os mais conservados.

O gene da proteína capsidial do JGMV desse estudo possui 924 nucleotídeos que codificam 308 resíduos de aminoácidos. Quando comparado com a sequência de aminoácidos deduzidos da proteína capsidial do isolado do JGMV australiano (303 aa) encontrou-se que há 59 substituições e 5 resíduos adicionais de aminoácidos, a maior variabilidade está na região N-terminal. Laidlaw et al. (2004) ao compararem a região que codifica a CP de 23 isolados australianos do JGMV encontraram que a região N-terminal foi a mais variável, 94% foi a maior porcentagem de identidade nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos. Embora a região N-terminal seja variável, o motivo DAG está presente no isolado do JGMV desse estudo, o qual é considerado essencial na transmissão dos potyvirus por afídeos (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994). Também foram identificados os motivos KTIC e PTK presentes na sequência de nucleotídeos que codifica a proteína HC-Pro também envolvida na transmissão por afídeos (REVERS et al., 1999). Nesse estudo conseguiu-se transmitir o JGMV pelo afídeo *Myzus persicae* de plantas de capim Mombaça infectadas para plantas sadias (dados não mostrados). Os motivos MVWCIENG e QMKAAA conservados no gene da CP dos potyvirus também foram identificados no isolado do JGMV desse estudo, embora no motivo MVWCIENG o aminoácido cisteína (C) foi substituído por alanina (A). É possível que essa diferença seja a causa para a não detecção desse potyvirus por RT-PCR quando foram

usados os oligonucleotídeos iniciadores universais PV1 e WCIEN (GIBBS; MACKENZIE, 1997; MOTA et al., 2004), comumente eficientes na detecção de diversos potyvirus. Em função desse fato e de posse da sequência de nucleotídeos do genoma completo desse vírus foram obtidos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção desse potyvirus mediante RT-PCR, para fins de diagnose. A alta especificidade do par de oligonucleotídeos iniciadores JGMV-CPF e JGMV-CPR na detecção do JGMV por RT-PCR é de grande importância, pois pode ser uma ferramenta para a correta detecção desse vírus e identificação de hospedeiros do vírus no campo.

Avaliou-se a suscetibilidade de diferentes espécies de poaceas produtoras de grãos e forrageiras à infecção com esse potyvirus por meio de inoculação mecânica. Dezesesseis dos sessenta e nove genótipos inoculados foram infectados e os extratos foliares reagiram positivamente no teste sorológico de PTA-ELISA usando antissoro policlonal contra a proteína capsidial do JGMV produzido nesse trabalho. *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. plantaginea*, *Cenchrus echinatus*, *Echinochloa colona*, *E. crus-galli*, *E. crus-pavonis*, *Melinis minutiflora*, *Panicum maximum* cv. Colônia, *Pennisetum setosum*, *Rhynchelytrum repens*, *Rottboellia exaltata*, *Sorghum bicolor* BRS 332, *S. bicolor* BRS 509, *S. bicolor* x *S. sudanense* BRS 802 e *S. verticilliflorum* apresentaram mosaico nas folhas. Somente *R. repens* apresentou visível redução no crescimento. Nas plantas infectadas não foram observados anéis nem necrose foliar, sintomas relacionados com a infecção com isolados do JGMV da Austrália em espécies suscetíveis (BRUNT et al., 1996 SHUKLA; TEAKLE, 1989).

Estudos da gama de hospedeiros de isolados do JGMV em outros países indicaram pequeno número de espécies suscetíveis, restritas às monocotiledóneas da família *Poaceae* (BRUNT et al., 1996; SHUKLA; TEAKLE, 1989; TEAKLE; GRYLLS, 1973). O isolado do JGMV desse estudo também infectou poucas espécies da família *Poaceae*, a maioria forrageiras. Espécies cultivadas como arroz, aveia, cana-de-açúcar, centeio, milho e trigo não foram infectadas com esse isolado. Entre os diversos acessos de sorgo avaliados nesse trabalho poucos foram suscetíveis à infecção (*S. bicolor* BRS 332, BRS 509 e *S. bicolor* x *S. sudanense* BRS 802), mesmo assim com poucas plantas infectadas. Chaves et al. (2001), no Brasil relataram a ocorrência de um isolado do JGMV infectando naturalmente híbridos e variedades de milho na região de Ribeirão Preto, SP. Isolados do JGMV da Nigéria, obtido de sorgo (JGMV-N) também não infectou aveia e trigo, enquanto

um isolado de *Brachiaria* spp. (JGMV-Bra) de ocorrência na Colômbia não infectou aveia, cana-de-açúcar e sorgo (MORALES et al., 1996; SEIFERS et al., 2005). Ao contrário dos isolados do JGMV da Venezuela e dos Estados Unidos, obtidos de sorgo e milho, respectivamente, que infectam aveia, milho e sorgo (GARRIDO; TRUJILLO, 1993; McDANIEL; GORDON, 1985).

Um fato que chama a atenção é a suscetibilidade do capim Johnsongrass aos diferentes isolados do vírus relatados em diferentes países. Na Austrália, onde esse vírus foi descrito pela primeira vez, recebeu o nome de JGMV por ter sido encontrado infectando essa espécie de forrageira (*S. halepense*) (TAYLOR; PARES, 1968). Enquanto os isolados do JGMV relatados na Austrália, Estados Unidos e Venezuela infectam capim Johnsongrass, os isolados do JGMV descritos na Colômbia, Nigéria e nesse estudo não infectam essa forrageira (GARRIDO; TRUJILLO, 1993; McDANIEL; GORDON, 1985; MORALES et al., 1996; SEIFERS et al., 2005). Na Austrália o capim Johnsongrass e *S. verticilliflorum* atuam como reservatórios perenes do vírus (TAYLOR; PARES, 1968; TEAKLE; GRILLS, 1973). *S. verticilliflorum* mostrou-se altamente suscetível ao isolado do JGMV desse estudo.

A variabilidade no gene da CP poderia explicar as diferenças na gama de hospedeiros do isolado de JGMV desse estudo. Na literatura, as alterações na superfície exposta da região N-terminal da CP dos potyvirus têm sido implicadas na proteção cruzada, definição da gama de hospedeiros e virulência das estirpes (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994). Xiao et al. (1993) compararam as sequências de nucleotídeos da região N-terminal da CP de sete estirpes do SCMV isoladas de diferentes espécies de poaceas (Bundaberg isolada de *S. verticilliflorum*, BC de *Digitaria didactyla*, Sabi de *Urochla mosambicensis*, SCMV-MDB de milho e Brisbane, Isis e SCMV-SC de cana-de-açúcar) e os resultados sugerem que a diversidade nessa região está correlacionada com propriedades biológicas, tais como a definição da gama de hospedeiros das estirpes. Suranto et al. (1997) observaram que alterações de aminoácidos na região N-terminal da CP do JGMV podem estar envolvidas na quebra da resistência no sorgo Krish introduzido da Índia, o qual contém um gene que confere alta resistência à estirpe de JGMV-Jg prevalente na Austrália. Na caracterização molecular de um isolado de *Pennisetum mosaic virus* (PenMV), potyvirus isolado de *Pennisetum centrasiaticum* no norte da China, novamente foi observada a alta variabilidade dessa região ao comparar com as sequências de outros potyvirus que infectam poaceas. Os autores atribuíram à

essa variabilidade as diferenças nas reações sorológicas e na gama de hospedeiros desses potyvirus (FAN et al., 2003).

Outra proteína codificada pelos potyvirus que pode estar relacionada com a definição da gama de hospedeiros é a P1. Embora a P1 do isolado desse estudo seja uma das proteínas com menor porcentagem de identidade com a do isolado do JGMV da Austrália, os motivos conservados H-(X8)-D-(X28)-FTHGSSG-(X10)-FIRG-(X19) foram identificados na região C-terminal, o sítio de autoclivagem entre P1 e HC-Pro foi quase idêntico ao relatado para JGMV (KQIKHY/S), pois somente o aminoácido cisteína (C) foi substituído por lisina (K) (GOUGH; SHUKLA, 1993; ADAMS; ANTONIW; BEAUDOIN, 2005). Valli, López-Moya e García (2007) analisaram a região que codifica a proteína P1 de 53 espécies de vírus de quatro gêneros da família *Potyviridae*, encontraram que embora a região C-terminal seja conservada, a região N-terminal estava afetada por eventos de recombinação e duplicação de genes. Diante disso sugeriram que esses eventos possivelmente poderiam contribuir na exitosa adaptação dos potyvirus a uma ampla gama de espécies de hospedeiros. Salvador et al. (2008) também avaliaram o papel da proteína P1 na definição de gama de hospedeiros. Para isso construíram vírus híbridos nos quais a sequência de nucleotídeos que codifica o gene da proteína P1 do *Plum pox virus* (PPV) foi integral ou parcialmente substituída pela sequência correspondente da proteína P1 do *Tobacco vein mottling virus* (TVMV). Estes potyvirus tem diferentes gamas de hospedeiros e em seus hospedeiros comuns induzem sintomas diferentes. As infecções induzidas pelos vírus híbrido (PVP/TVMV) revelaram que a sequência da P1 do TVMV não afetou a suscetibilidade das espécies hospedeiras do gênero *Nicotiana* a PPV, enquanto que em *Prunus persicae*, hospedeiro específico do PPV, o PVP/TVMV não causou infecção, sugerindo que a proteína P1 do TVMV não é funcionalmente competente nessa planta. Esses resultados mostraram a importância da proteína P1 codificada pelos potyvirus na definição da gama de hospedeiros.

Embora a constatação do JGMV pela primeira vez no Brasil não seja recente (CHAVES et al., 2001) há evidências de que ele pode ocorrer em diferentes regiões do país. Não há relatos até o momento sobre danos causados por esse vírus no país. A não infecção experimental de gramíneas cultivadas tais como arroz, aveia, cana-de-açúcar, centeio, milho e trigo pelo isolado do JGMV de capim Mombaça é fato positivo para o momento. Porém a constatação desse vírus infectando

naturalmente *Pennisetum purpureum* e *Panicum maximum* cv. Mombaça e experimentalmente outras espécies forrageiras demonstram a importância de se avaliar a ocorrência natural deste vírus em outras espécies de *Poaceae*, das quais algumas são usadas em pastagens.

3 CONCLUSÃO

O agente etiológico associado às plantas doentes de *Panicum maximum* cv. Mombaça provenientes de São Luiz do Paraitinga, SP foi identificado como uma estirpe do *Johnsongrass mosaic virus*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.J. **Cleavage sites in the family *Potyviridae***. 2013. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/potycleavage/>>. Acesso em: 23 set. 2014.
- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 6, n. 4, p. 471-487, 2005.
- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Archives of Virology**, Vienna, v. 150, n. 3, p.459-479, Mar. 2005.
- ADAMS, M.J.; ZERBINI, F.M.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D.C; VALKONEN, J.P.T. Family *Potyviridae*. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of viruses; ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012. p. 1069-1089.
- BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L.; ZURCHER, E.J. (Ed.). **Plant viruses online**: descriptions and lists from the VIDE database. Version: 20 Aug. 1996. Disponível em: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>>. Acesso em: 09 maio 2014.
- CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; FANTIN, G.M. Detecção e identificação sorológica do *Johnsongrass mosaic virus* em milho no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p.513-514, 2001. Suplemento.
- CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M.J. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of Virology**, Vienna, v. 146, n. 4, p. 757-766, May 2001.
- CHUNG, B.Y.W.; MILLER, W.A.; ATKINS, J.F.; FIRTH, A.E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, Apr. 2008.
- DUFFUS, J.E.; LARSEN, R.C.; LIU, H.Y. Lettuce infectious yellows virus: a new type of whitefly-transmitted virus. **Phytopathology**, Saint Luis, v. 76, p. 97-100, Jan. 1986.
- FAN, Z.; CHEN, H.; CAI, S.; DENG, C.; WANG, W.; LIANG, X.; LI, H. Molecular characterization of a distinct potyvirus from whitegrass in China. **Archives of Virology**, Vienna, v. 148, n. 6, p. 1219-1224, Mar. 2003.
- GARRIDO, M.J.; TRUJILLO, G.E. Occurrence of *Johnsongrass mosaic virus* on sorghum in Venezuela. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 8, p. 847, Aug. 1993.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 63, n. 1/2, p. 9-16, Jan. 1997.

GOUGH, K.H.; SHUKLA, D.D. Nucleotide sequence of *Johnsongrass mosaic potyvirus* genomic RNA. **Intervirology**, New York, v. 36, n. 3, p. 181-192, 1993.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 3, p. 111-120, Sept. 1980.

LAIDLAW, H.K.C.; PERSLEY, D.M.; PALLAGHY, C.K.; GODWIN, I.D. Sequence diversity in the coat protein coding region of the genome RNA of Johnsongrass mosaic virus in Australia. **Archives of Virology**, Vienna, v. 149, n. 8, p. 1633-1641, Apr. 2004.

LAPIERRE, H.; SIGNORET, P.A. **Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)**. Montpellier: Institut National de la Recherche Agronomique; Editions Quae, 2004. 857 p.

MARCHI, C.E.; FERNANDES, C.D.; VERZIGNASSI, J.R. **Doenças em plantas forrageiras**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2011. 32 p.

MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D.; LEFEUVRE, P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, London, v. 26, p. 2462-2463, 2010.

McDANIEL, L.L.; GORDON, D.T. Identification of a new strain of *Maize dwarf mosaic virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 7, p. 602-607, July 1985.

McKERN, N.M.; WHITAKKER, L.A.; STRIKE, P.M.; FORD, R.E.; JENSEN, S.G.; SHUKLA, D.D. Coat protein properties indicate that *Maize dwarf mosaic virus*-KS1 is a strain of *Johnsongrass mosaic virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 10, p. 907-912, Oct. 1990.

McKERN, N.M.; SHUKLA, D.D.; TOLER, R.W.; JENSEN, S.G.; TOSIC, M.; FORD, R.E.; LEON, O.; WARD, C.W. Confirmation that the *Sugarcane mosaic virus* subgroup consists of four distinct potyviruses by using peptide profiles of coat proteins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 9, p. 1025-1029, Sept. 1991.

MORALES, F.J.; OSPINA, M.D.; CASTAÑO, M.; CALVERT, L.A. Sequence analysis of the genomic RNA 3'-terminal region of a potyvirus from *Brachiaria spp.* related to *Guineagrass mosaic virus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 485-489, Nov. 1996.

MOTA, L.D.C.; DELLA VECCHIA, M.G.S.; GIORIA, R.; KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A.; AMORIM, L. *Pfaffia mosaic virus*: a new potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. **Plant Pathology**, Farnham Royal, v. 53, n. 4, p. 368-373, Aug. 2004.

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 233-247, Feb. 1987.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 333 p.

REVERS, F.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; MAULE, A.J. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 5, p. 367-376, May 1999.

SALVADOR, B.; SAÉNZ, P.; YANGÜEZ, E.; QUIOT, J.B.; QUIOT, L.; DELGADILLO, M.O.; GARCÍA, J.A.; SIMÓN-MATEO, C. Host-specific effect of P1 exchange between two potyviruses. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 2, p. 147-155, Mar. 2008.

SEIFERS, D.L.; HABER, S.; ENS, W.; SHE, Y.M.; STANDING, K.G.; SALOMON, R. Characterization of a distinct *Johnsongrass mosaic virus* strain isolated from sorghum in Nigeria. **Archives of Virology**, Vienna, v. 150, n. 3, p. 557-576, Mar. 2005.

SEIFERS, D.L.; SALOMON, R.; MARIE-JEANNE, V.; ALLIOT, B.; SIGNORET, P.; HABER, S.; LOBODA, A.; ENS, W.; SHE, Y.M.; STANDING, K.G. Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 5, p. 505-513, May 2000.

SHUKLA, D.D.; TEAKLE, D.S. *Johnsongrass mosaic virus*. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, Warwick, n. 340, 1989. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=340>>. Acesso em: 09 maio 2014.

SHUKLA, D.D.; GOUGH, K.H.; WARD, C.W. Coat protein of potyviruses. **Archives of Virology**, Vienna, v. 96, n. 1/2, p. 59-74, Mar. 1987.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. Cambridge: Cambridge University Press; Centre for Agriculture and Biosciences International, 1994. 516 p.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A.; BERGER, P.H. *Potyviridae* family. **CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses**, Warwick, n. 366, 1998. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=366>>. Acesso em: 26 maio 2014.

SHUKLA, D.D.; TOSIC, M.; JILKA, J.; FORD, R.E.; TOLER, R.W.; LANGHAM, M.A.C. Taxonomy of potyviruses infecting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the USA as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus specific amino terminal of coat proteins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 2, p. 223-229, Feb. 1989.

SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J.; McKERN, N.M.; WARD, C.W.; JILKA, J.; TOSIC, M.; FORD, R.E. Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. **Archives of Virology**, Vienna, suppl. 5, p. 363-373, 1992.

SILVA, K.N.; NICOLINI, C.; SILVA, M.S.; FERNANDES, C.D.; NAGATA, T.; RESENDE, R.O. First report of *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) infecting *Pennisetum purpureum* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 7, p.1003, July 2013.

SILVA, M.S.; FERNANDES, C.D.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W.; MARCHI, C.E.; CHARCHAR, M.J.A.; ANJOS, J.R.N.; MÁXIMO, R.M.; PEREIRA, L.M. Inclusões citoplasmáticas típicas de infecção viral em forrageiras dos gêneros *Panicum* e *Stylosanthes*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 192, 2006. Suplemento.

SURANTO; GOUGH, K.H.; SHUKLA, D.D.; PALLAGHY, C.K. Coat protein sequence of Krish-infecting strain of Johnsongrass mosaic potyvirus. **Archives of Virology**, Vienna, v. 143, n. 5, p. 1015-1020, Apr. 1998.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, n. 30, p. 11030-11035, July 2004.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, Oct. 2013.

TANAKA, F.A.O.; KITAJIMA, E.W. **Treinamento de técnicas em microscopia eletrônica de transmissão**. Piracicaba: ESALQ, Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, 2010. 48 p.

TAYLOR, R.H.; PARES, R.D. The relationship between sugarcane mosaic virus and mosaic viruses of maize and Johnson grass in Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 19, n. 5, p. 767-773, 1968.

TEAKLE, D.S.; GRYLLS, N.E. Four strains of sugarcane mosaic virus infecting cereals and other grasses in Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne v. 24, n. 4, p. 465-477, 1973.

TOSIC, M.; FORD, R.E.; SHUKLA, D.D.; JILKA, J. Differentiation of sugarcane, maize dwarf, Johnsongrass, and sorghum mosaic viruses based on reactions of oat and some sorghum cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, p. 549-552, Aug. 1990.

TOTH, I.K.; HYMAN, L.J.; BERTHEAU, Y.; FRÉCHON, D. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: PÉROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLF, J.M. (Ed.). **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes**: a laboratory manual. Dundee: Scottish Crop Research Institute, 2002. p. 44-65. (Occasional Publication, 10).

VALLI, A.; LÓPEZ-MOYA, J.J.; GARCÍA, J.A. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*. **Journal of General Virology**, London, v. 88, n.3, p. 1016-1028, Mar. 2007.

WEI, T.; ZHANG, C.; HONG, J.; XIONG, R.; KASSCHAU, K.D.; ZHOU, X.; CARRINGTON, J.C.; WANG, A. Formation of complexes at plasmodesmata for *Potyvirus* intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. **PLoS Pathogens**, San Diego, v. 6, n. 6, e1000962, doi:10.1371/journal.ppat.1000962, June 2010.

XIAO, X.W.; FRENKEL, M.J.; TEAKLE, D.S.; WAR, C.W.; SHUKLA, D.D. Sequence diversity in the surface-exposed amino-terminal region of the coat proteins of seven strains of *Sugarcane mosaic virus* correlates with their host range. **Archives of Virology**, Vienna, v. 132, n. 3/4, p. 399-408, Sept. 1993.

YANG, X.; CHARLEBOIS, P.; GNERRE, S.; COOLE, M.G.; LENNON, N.J.; LEVIN, J.Z.; QU, J.; RYAN, E.M.; ZODY, M.C.; HENN, M.R. De novo assembly of highly diverse viral populations. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 475, Sept. 2012.

APÊNDICES

gcgaaatcggttacttaaagtgcgagctagcgacgagaaccaaagggtgataatagggcag
 A K S L L K V R A S D E N Q M V I I G Q
 aatcttctggaaattgccagatggttttcaaagagacataaagcaggcccaacagatgat
 N L L E I A R W F S K R H K A G P T D D
 ctgagcacatacaagaataaagttgcagcaagaggtggttggttaatgcattgatgtgt
 L S T Y K N K V A A R G V V G N A L M C
 gacaatcaactggataaaaaatgggtgattttctatgggggtcaaagagcatatcatgcgaaa
 D N Q L D K N G D F L W G Q R A Y H A K
 agatttttatcaaacttttatgacattggtgatccaactgacgattatgacaagcacggt
 R F L S N F Y D I V D P T D D Y D K H V
 atccgtagatcaccaagaagccaacgtcattttagctattgggaagctaatagtgacaatg
 I R R S P R S Q R H L A I G K L I V T M
 gatcttgagcagatgagatccagacttgcggtttgccgtgtaaaccaggcggaattgaa
 D L E Q M R S R L V G L P C K P G G I E
 caacattgcattgggtcggttgatggcaacattatccatgcagttgtgtgacacaa
 Q H C I G R L N G N I I Y P C S C V T Q
 gagagtggcaagccattgtggagtgaattgataatgccaaactaaggaaacacatttcattg
 E S G K P L W S E L I M P T K E H I S L
 ggcaaccttgctgacccacatttggttgacttaccacaatcggatccaccacagatgtat
 G N L A D P H L V D L P Q S D P P Q M Y
 attgttaaagatggatactgctacttgaaatattttcttagccatgctgatatatgtgaaa
 I V K D G Y C Y L N I F L A M L I Y V K
 gaagatgccgcgcaaaagattttacaaagtttatatcgggacagaattcaaccgagactcaag
 E D A A K D F T K F I R D R I Q P R L K
 gaatggccgctcattaaaagatgtggcaacagcttgctattttaacaacaatattctatcct
E W P S L K D V A T A C Y L T T I F Y P
 gaaacactacaagcagaaattccaaagattttggttgatcatgaaacaaaactatgcat
 E T L Q A E I P K I L V D H E T K T M H
 gttgttgatacatttggttcactatccactggataccacatattgaaggcaagtacagta
V V D T F G S L S T G Y H I L K A S T V
 gcacaactaataaggttttcatacaatgacttgcaagtgaagtgaaggagtatatagtc
 A Q L I R F S Y N D L S S E M K E **Y I V**
 gga
G/

P3

gggtgatttgggtacatgggacaacagtttagattaatcgagtgccttgatcaaagggatattc
G D L V H G T T V R L I E C L I K G I F
 aataaagcatattttgcaacaaatcataattgaagaacctttcctactattatttagctatt
 N K A Y L Q Q I I I E E P F L L L L A I
 gaatcaccatgcggttttgattaatatgtacaataatggcaactttgagaccgctatgaaa
 E S P C V L I N M Y N N G N F E T A M K
 tattattcaactagaaatatgccattgacaaaatttattcgccgcaatggaaagttttgcc
 Y Y S T R N M P L T N L F A A M E S F A
 aaaagggtagtaaagcagatatatttgctgagcagttgaacatcatggaacaagccgcc
 K R V S K A D I F A E Q L N I M E Q A A
 tatgacattcatgctcgtatggccggaacatatgtgaacgaccactagccagatatgtc
 Y D I H A R M A G T Y V N D P L A R Y V
 aagcaccacttgatagtcgatgaacagagctgacatgaacgcacaactgaagttagaa
 K H L I V M M N R A D M N A Q L K L E
 gggcacacaataattcgataggtcgtatgagataattgagaaaaatacgcgaagcgac
 G H T I F D S R S Y E I I E K K Y A S D
 atacaaacatcatggcaagagctaagttgggttgaaaaatcgcgcttggtttcacagtta
 I Q T S W Q E L S W L E K S R L V S Q L
 tactttacaaagaaatcacagcatcagtgataaaacgaaagaaagcacagatttaggc
 Y F T K K S Q H Q C I K P K E S T D L G
 ggaatctacaatatatctccaatgctgctggtttcaggatttccagagaaaacttcacaca
 G I Y N I S P M L L V S G F H E K L H T
 aaagccaactctattttctcagaaactccaatccacatacaattcagtaaaacacaaattc

K A N S I S Q K L Q S T Y N S V K H K F
 cggggagggtattcttaaaacagcatcacaggtgcctgccagacacactgaagttgatgcac
 R G G I L K T A Y R C L P D T L K L M H
 gttgccattgtcatgagttgcgtttcatcaatattattatcagtatgcgcagctggcggtt
 V A I V M S C V S S I L L S V C A A G V
 gaatataagaaatacaagagggaagcactgcgtgagcaaatcgagagggagggaacaaatg
 E Y K K Y K R E A L R E Q I E R E E Q M
 gtcgaggcactacatgcacaattcatgcttgacaaccgattctcggggacagaaagagaa
 V E A L H A Q F M L D N R F S G T E R E
 ttcattatgcgtgtcgcagaaaaatccccacatttaacaccgcgagcgctcgcaatgggtg
 F I M R V E K N F P H L T P R A L A M V
 aaaacggaagtggagcatgaa
 K T E **V E H E**/

PIPO

atacgcgaagcgacatacaaaacatcatggcaagagctaagttgggttgaaaaatcgcgctt
 I R K R H T N I M A R A K L V G K I A L
 ggtttcacagttatactttacaaagaaatcacagcatcagtgataaaaccgaaagaaag
 G F T V I L Y K E I T A S V Y K T E R K
 cacagatttaggcggaatctacaatatatctccaatgctgctgggttcaggatttcacga
 H R F R R N L Q Y I S N A A G F R I S R
 gaaacttcacacaaaagccaactctatttctcagaaactccaatccacatacaattcagt
 E T S H K S Q L Y F S E T P I H I Q F S
 aaaacacaaattccggggagggtattcttaa
 K T Q I P G R Y S -

6K1

agaaagggatacgcggaacttaaatgggaacaagtcattgcggttgctaccttgctgaca
R K G Y A E L K L E Q V I A F A T L L T
 atgctctatgatgctgaaaggagtgacgcagtcctacaagatactccaaaagataaaagct
 M L Y D A E R S D A V Y K I L Q K I K A
 tgcacaaacatctgtacacaagaagttaaacatgaa
 C T N I C T Q E **V K H E**/

CI

ggatcacaaattgatgaagtgcgaagagttagaaaaacctcaaacgtttaactgttgatttt
G S Q I D E V Q E L E N L K R L T V D F
 aacattgagcaagataaccaccatcgattgcagtacacgatacaacatttgagaaatgg
 N I E Q E I P P S I A V H D T T F E K W
 tggactacacaaattacacaaagtagaacaacaacgcactacagaaacaagggtgaattc
 W T T Q I T Q S R T T T H Y R N K G E F
 cttgagttttcacgaagcaatgctatagcgggttgtaatagaatagctcatggttcagac
 L E F S R S N A I A V C N R I A H G S D
 tccaaacacttttctggtcagaggcaatgtaggatctgggaaatcaacagctataccaagg
 S K H F L V R G N V G S G K S T A I P R
 tatctaagcgataaaaggtaaagtgttaatactcgaaccaacaaggccactcacagagaac
 Y L S G D K V L I L E P T R P L T E N
 gtgtgtcaacaattacagaatgagccttggtgcctggaccctacaatgcagatgcgaggt
 V C Q Q L Q N E P W C L D P T M Q M R G
 aagagcatatttggtcaacaccgataaccataatgacaacgggattcgcattacatctg
 K S I F G S T P I T I M T T G F A L H L
 ttcgctaacaacggttgaaagattatcagaatacaagttcatcttttcgatgaatgccat
 F A N N V E R L S E Y K F I I F D E C H
 gttgtcgattcaaatgcaatggctttctcctgtctcttagaggagtataaatacaacgga

V V D S N A M A F S C L L E E Y K Y N G
 aaaatcatctcagtttcagccacaccaccagggcgagagtcggaattccaaacagagaag
 K I I S V S A T P P G R E S E F Q T E K
 ccagttgacctcagagtatattgaggatgtctcttttcgacacattcgttatggagcagggc
 P V D L R V F E D V S F D T F V M E Q G
 acggggtcgaatctggatgcagtttccgtgtgcgattcaattctagtttacgtcgcaagt
 T G S N L D A V S V C D S I L V Y V A S
 tacaatgaagttgatcaaattgagccgacttctgaacgagaaaaggatacacagtcaccaag
 Y N E V D Q M S R L L N E K G Y T V T K
 gttgatggaaggaccatgaatggtggcaacaagtcaggtggttagtttgaacaaacacata
 V D G R T M N G G N K S G G S L N K H I
 cacatcagcctgaacgaaaagctacaagcgcagatcaaagagcatggaaaacattttata
 H I S L N E K L Q A Q I K E H G K H F I
 gtcgccaccaacataattgagaatggtgttacacttaattgtggatggagtggtcgacttt
 V A T N I I E N G V T L N V D G V V D F
 ggaacaaaagtcgtcgctgacctggatgtcgacaatcgttcaatcatatatcagaagata
 G T K V V A D L D V D N R S I I Y Q K I
 ccgatttcatatggtgaaagagttcaaagactggggagagttgggcgcttcaagaaaggc
 P I S Y G E R V Q R L G R V G R F K K G
 tacgctttcagaattgggaccacacagaaaggaatagttgatatcccagctatgacagca
 Y A F R I G T T Q K G I V D I P A M T A
 acagaggcagcatttttatgctttgcatatgggttacctgtgatcacacacaatgtatcc
 T E A A F L C F A Y G L P V I T H N V S
 acaacacatctatctcatgtcacgagcgcacaaagccagaaccatgcttcagttcgaattg
 T T H L S H V T S A Q A R T M L Q F E L
 ccaatcttcatgatgagtgagtttagtcaaatatgatgggcacatgcacccggcaatacac
 P I F M M S E L V K Y D G H M H P A I H
 gaaatattaaagcagttcaagttaagagactcctctattagcttgcgagatacggcacta
 E I L K Q F K L R D S S I S L R D T A L
 ccacaaaaatgcaagtgacttgtggctgagtgcgggcacttacaagaagcttggctataag
 P Q N A S D L W L S A G T Y K K L G Y K
 atagacttgccagatgactgtaaaatcccatattatgtgaatggtgtaagtgttaggatg
 I D L P D D C K I P Y Y V N G V S A R M
 tatgagcagatttggaaatgcagtgaaagacttttaggcaaacgtgctgtatgagacgaatg
 Y E Q I W N A V K D F R Q T C C M R R M
 acgagttcatgtgcaggggaagatcgcatcacgctccaaacagatgttaatgcgatccct
 T S S C A G K I A Y T L Q T D V N A I P
 agaacactcgcaataatagatgggttgattaaaggaagagcaaattaaacacagccatttt
 R T L A I I D G L I K E E Q I K H S H F
 cagatgtgcagcgaactcgacttcatcatataacttctcattgaatggaataatggac
 Q S M S A N S T S S Y N F S L N G I M D
 atgttacgcagcagatatatgaaagaccacagtggtggacaacatagctaagcttgagatg
 M L R S R Y M K D H S V D N I A K L E M
 gtcaagaatcagattatagaattttcaaagcctccatcaattatagagatgtcgatttt
 V K N Q I I E F S N A S I N Y R D V D F
 ataaaacacttttgagcactgcaaacagttatccatgag
 I K H F G A L Q T **V I H E**/

6K2

aataaagaagatgtgtgcaaggagcttgacctcaaaggaatatggaatgagaaattgatg
N K E D V C K E L D L K G I W N E K L M
 tgccgagacggtatcattgcagcaggagtggtcgattggaggtgtattaattggctgggaa
 C R D G I I A A G V A I G G V L I G W E
 tgcttttaaatattattttcatgacagaagttgagcacgaa
 C F K Y Y F M T E **V E H E**/

VPg

ggtaagtctaagcgaacaaaacagaaactgagatttcgggacgcacgtgataggaaagtt
G K S K R T K Q K L R F R D A R D R K V
 ggacgagaagtttacgggatgacgcaacaattgagcacttcctttggagaagcttacacc
 G R E V Y G D D A T I E H F F G E A Y T
 aagaaaccaaagaaaggggaacaaaacacatggcatgggctttaaaacgaggaggttcaca
 K K P K K G N K T H G M G F K T R R F T
 catatatatgggtgtagatccgaccgaatatgacatgattcgctttgtagaccctctaaca
 H I Y G V D P T E Y D M I R F V D P L T
 ggcacaacgtttagatgaatccacacaggctgacatgtcattagtcaggagcactttgcg
 G T T L D E S T Q A D M S L V K E H F A
 aacgtgcgcggaagcatatgttgagaacgatatacttgacgtcaacatctataactcaaat
 N V R E A Y V E N D I L E R Q H L Y S N
 ccaggggttcacgcatatttcatcaaaaacaacgcgagcaatgctcttaaagtggacttg
 P G V H A Y F I K N N A S N A L K V D L
 acattacacaatccattagcgctgtgcagaacgaatgcgattgcaggattccctgaacgc
 T L H N P L A L C R T N A I A G F P E R
 gaggggtgagctgcgacagacaggctcctagcatatcgattccaagggatgaagtaccagag
 E G E L R Q T G P S I S I P R D E V P E
 cagaatgagccagaagtagagcatgaa
 Q N E P E **V E H E/**

Nla-Pro

ggcacatcagcgatccatggggttgccaactacaatccaatatcagacaacatctgtttg
G T S A I H G V A N Y N P I S D N I C L
 ttgaagaatgactcggatgggagaaacatcgaattgtacggaattggatatgggtgcttat
 L K N D S D G R N I E L Y G I G Y G A Y
 gtgacgcaccgagctacttattcgagagcaataatggatcactacatatacgttcaacc
 V I A P S H L F E S N N G S L H I R S T
 agaggggttatataagattccaaacacacaagctctaaaaatttcagcaatagaggggaaga
 R G L Y K I P N T Q A L K I S A I E G R
 gacattatactcatacgtttaccgaaagatcacctccattcacgcgatccataaaattc
D I I L I R L P K D H P P F T R S I K F
 agtgaaccggataagtacgacaagggttataatgctccgaatgaactttcaacagaataaa
 S E P D K Y D K V I M L R M N F Q Q N K
 agcattgttgaaattctcagaaagttctataatagcacagcaaagcgccagtttctggaag
 S I V E F S E S I I A Q Q S A S F W K
 cattggatttcaaccaaggcagggttattgtggactccacttggttaacacacggacgaaa
 H W I S T K A G Y C G L P L V N T R T K
 gaagtgggtgggcatccatagtctgaaagcaacaaacaacagtggtgaactatttcacatca
E V V G I H S L K A T N N S V N Y F T S
 gtgaatgctgatttgattggaaaattggcgctcgacgtggaaacaattcaatggacaaaa
 V N A D L I G K L A L D V E T I Q W T K
 ggatggaagtataatgaacacttggtggcatgggatgggtctgcatttgaggaactctaag
 G W K Y N E H L L A W D G L H L R N S K
 ccagccaagctttcaacacagcgaaggagattgaagtcgtcaacgaacgagtttctaac
 P S Q A F N T A K E I E V V N E R **V S N**
 gag
E/

Nlb

agtactgatacatggctatcaagacagtttaatgaaaacctcagtggttggtggaatta
S T D T W L S R Q F N E N L S V V G E L
 ccaggaaacctagtcactaaacatggttgtaaaaggcaaatgccaaactattccaactattc
 P G N L V T K H V V K G K C Q L F Q L F
 atgagtgctgatgaacaagcaggaaaatactttgaaccattgtgcgggcactacagcaag

M S V D E Q A G K Y F E P L C G H Y S K
 agttttattgaacaggagtgcatcattcatcaaggatttcacaaaatatgacaaaccaatagta
 S L L N R S A F I K D F T K Y D K P I V
 gttgggactgtgaaaccgaacgagttcgaaatggccactaaagatgtcatcaacatgta
 V G T V K P N E F E M A T K D V I N M L
 cacaaccttggcatgaaagactgcaactatgtcacgattgcagatgaaatztatggtgca
 H N L G M K D C N Y V T I A D E I Y G A
 atgaacatgaaggcatccggttgagcgctatacaacggaaagaaacgggagtgacttcgcc
 M N M K A S V G A L Y N G K K R E Y F A
 aacttcaccgatgagcagaaggagaaacttatggaagagtcatgtaaacgattgtactgt
 N F T D E Q K E K L M E E S C K R L Y C
 ggtgaacttggtgtgtggaatggttcacttaaagcggagattcgccaatggagaaaata
 G E L G V W N G S L K A E I R P M E K I
 cttgctaataagacgcgaacattttacagcagcacctcttgagacactcataggtggaag
 L A N K T R T F T A A P L E T L I G G K
 gtatgcggtgatgatttcaacaaccagttttatcagaatcatcttaaaggaccctggaca
 V C V D D F N N Q F Y Q N H L K G P W T
 gtaggtatatccaaattttataagggttgggattctctgatgagaagattaccagaaaaac
 V G I S K F Y K G W D S L M R R L P E N
 tgggtgtactgtgatgcagatggatctcaatttgacagttcactaacaccataacttgata
 W V Y C D A D G S Q F D S S L T P Y L I
 aacgcagttctacagattcggttggtcatggaaaagtggaacattggtgagaagatg
 N A V L Q I R L A C M E K W D I G E K M
 ttatcaaactatatacacagagatagtttacacaccaatagccacaccagacggaaggatt
 L S N L Y T E I V Y T P I A T P D G R I
 gttaaaaagttcaaaggggaataatagtgggcagccatcgacagtcgtggataacacatta
 V K K F K G N N S G Q P S T V V D N T L
 atgcttattctagcattcacgtatgcactgcgggtcaacaacattgaaaactttgagcag
 M L I L A F T Y A L R V N N I E N F E Q
 gatgatataatcaaaatgtttggcaatggtgacgacttgctaattgcagtgagaccagac
 D D I I K M F G N G D D L L I A V R P D
 tttgaatatctgctagacacattcacaggacacttttgctgaccttggcttgaactttgat
 F E Y L L D T F T G H F A D L G L N F D
 ttttctaaccaggacaagaaatagagaggatctatgggtttatgtcacatcggggtatgctg
 F S N R T R N R E D L W F M S H R G M L
 aaggatggggtctatatataccaaaattggaaccagagagggtcgtagctatcttgagtggtg
 K D G V Y I P K L E P E R V V A I L E W
 gatagaagcgtcgaaccagaacatcgctctcagcaatatgcgcagcaattatcgaatca
 D R S V E P E H R L S A I C A A I I E S
 tggggttatgaggagctaacctatcaaatccgacgggttctaccagtgggtcctcgagcaa
 W G Y E E L T Y Q I R R F Y Q W V L E Q
 gagccatacaaggaattggcattacagggcaaagccccatacttgtcggagacagctctg
 E P Y K E L A L Q G K A P Y L S E T A L
 cgcaagttataccttgatgagtcatgtgatcagagcgagctgctacattattatgaagaa
 R K L Y L D E S C D Q S E L L H Y Y E E
 atgtataagaatgccacaatgagtgatgatgtagtggtgacgtcgagcatcag
 M Y K N A T M S D D V V D **V E H Q**/

CP

tcaggaaatgaagacgctggaaagccaaaaacaacacccaaaaacaacagaccacactgga
S G N E D A G K P K T T P K T T D P P G
 aacaatgggttcaggtagaccagcaccagttacaaacccaccagcaaataacaacccacct
 N N G S G T P A P V T N P P A N N N P P
 tcaaacacaacgatggaaaacccaaaacccaagaaacacctagaacagtggaatgga
 S N N N D G K P K T Q E T P R N S G N G
 ggctcaggtggaacagtagttacaacacctaacaagatcgggatggtgatgctggttca
 G S G G T V V T T P K Q D R D V D A G S
 aggggaactttcacgataccaaaactcaagaaagtctcaccaaagatgcgtctaccaatg
 R G T F T I P K L K K V S P K M R L P M

gtgagcaacaaatcgatcctaatacatagatcatctgattcaatacaaaccagatcagaga
 V S N K S I L N I D H L I Q Y K P D Q R
 gacatctcaaagcccggtgcgacacaccaacaattccaattttggtataaccgcatcaag
 D I S N A R A T H Q Q F Q F W Y N R I K
 aaagaatatgatgttgatgacgagcaaatgaaaattttaatggacggatttatggtatgg
 K E Y D V D D E Q M K I L M D G F M V W
 gcaattgagaacggaacatctcctgatattaatggttattggaccatgatggatggtgag
 A I E N G T S P D I N G Y W T M M D G E
 acgcagtcagaattttccactaaaaccagttgtggagaatgctaaaccaacattacgacag
 T Q S E F P L K P V V E N A K P T L R Q
 tgcattgatgcatttttagtgatgccgcagaaagcatatattgaaatgaggaatttagatgaa
 C M M H F S D A A E A Y I E M R N L D E
 ccaatatgccaaaggtatggtcttcttaggaatctaaatgacaaaagcctagctcgatac
 P Y M P R Y G L L R N L N D K S L A R Y
 gcaatttgatttctatgagattaattcgcgtagacaccaaatagggcaagagaggcacatgca
 A F D F Y E I N S R T P N R A R E A H A
 caaatgaaagcagctgccatcagaggggctacaaataatttatttgggtcttgatggtaat
 Q M K A A A I R G A T N N L F G L D G N
 gttggtgagagttctgagaacacagagcgacacacggcagcagatgtcgcacggaatggt
 V G E S S E N T E R H T A A D V A R N V
 cattcataccgtggggctaaaatc
 H S Y R G A K I

Região 3' não traduzida

taagaagaaggaacaaccgtctatctgacgtaaaaggatgactgaccaagtctgaaaatt
 ggtatgatactggattttaatagtcatacagagtcagagatgaacagagagcactataa
 aagtgtagtagagatcgagagataacatgtaagccctcaatgaccatgcctaagcgctag
 cattgtgtggagctctaactctaaggagttatcttccaggatttggtaatctcgtacctc
 gaaacacttatgagccctcagcatcagacgacactgggactatgtatctttacttggtaa
 tcaactagtattataaatcgttctgcacgttacgagtggtgttttacaccctgggtgggg
 ttctaagtctgtgttacagttacgaacaacggcccgtaatgatcgtattttactagttgca
 tcaaacatatgaacctaaagagtgaagcttctcaccacagtttcatatggcgagata