



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**Análises biológicas, sorológicas e moleculares de plantas  
de amendoim infectadas por vírus obtidas em áreas  
produtoras de São Paulo**

**Michelle Barros Pantoja**

**Recife-PE  
2015**

**MICHELLE BARROS PANTOJA**

**ANÁLISES BIOLÓGICAS, SOROLÓGICAS E MOLECULARES DE PLANTAS DE  
AMENDOIM INFECTADAS POR VÍRUS OBTIDAS EM ÁREAS PRODUTORAS DE  
SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE) - Orientador

Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira de Carvalho (UnB) - Co-orientadora

Dra. Genira Pereira de Andrade (UFRPE) - Co-orientadora

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO - 2015**

## Ficha catalográfica

P198a Pantoja, Michelle Barros  
Análises biológicas, sorológicas e moleculares de plantas de amendoim infectadas por vírus obtidas em áreas produtoras de São Paulo / Michelle Barros Pantoja. – Recife, 2015.  
84 f.: il.

Orientador: Gilvan Pio Ribeiro.  
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2015.  
Referências.

1. *Arachis hypogaea* L. 2. Detecção 3. Vírus I. Ribeiro, Gilvan Pio, orientador II. Título

CDD 632

**ANÁLISES BIOLÓGICAS, SOROLÓGICAS E MOLECULARES DE PLANTAS DE  
AMENDOIM INFECTADAS POR VÍRUS OBTIDAS EM ÁREAS PRODUTORAS DE  
SÃO PAULO**

**MICHELLE BARROS PANTOJA**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 26/02/15

**ORIENTADOR:**

---

Dr. Gilvan Pio Ribeiro - UFRPE

**EXAMINADORES:**

---

Dra. Sandra Roberta Vaz Lira Maranhão - UFRPE

---

Dr. Francisco Miguel de Assis Filho - MAPA

---

Dra. Genira Pereira de Andrade - UFRPE

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO - 2015**

*Às filhas do coração Emanuele e Luana  
Vilhena, ao meu namorado Isaque Pantoja,  
aos meus irmãos Ana Cristina, Jackeline e  
Cléb Pantoja, aos sobrinhos Andreza,  
Andrey, Helenna e Cecília Pantoja*

## **OFEREÇO**

*Aos meus maiores educadores, meus  
pais, Osvaldo Pantoja e Creuza  
Barros, pelos ensinamentos, força,  
consolo e amor incondicional*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre me proteger, impor força e confiança nos mais variados desafios que superei durante esta jornada;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Universidade (UFRPE) de Brasília (UnB), por me darem a oportunidade de efetivação do Curso de Mestrado em Fitopatologia;

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão do Auxílio Mobilidade Discente;

Ao Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro pela orientação, ensino, respeito, amizade e exemplo de ética profissional;

A pesquisadora Dra. Genira Pereira de Andrade, pelos ensinamentos, amizade e dedicação durante todo o curso;

A Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira de Carvalho da UnB por me receber com carinho, pela amizade, dedicação na orientação e pelos ensinamentos e exemplo de humanidade como pessoa;

Aos Professores Dr. Renato de Oliveira Resende e Dr. Tatsuya Nagata da UnB pelo apoio no desenvolvimento do trabalho;

Ao Dr. Ignácio J. Godoy e Dr. João Francisco dos Santos, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pela colaboração com a coleta de amostras em São Paulo;

Aos Professores da Área de Fitossanidade, pelos ensinamentos durante o curso;

Aos estagiários da UFRPE, Priscila Costa, Júlio Lima e Priscila Ferreira que me apoiaram nos trabalhos;

Às pesquisadoras Rosana Blawid, Mariana Martins e Anelise Orilio da UnB, pela colaboração, amizade e bons ensinamentos e aos estudantes da UnB: Leticia Goulart, Josiane Goulart, Brenda Bezerra, Mariana Calaça, Bruna Lima, Pedro, Caroline Amaral e Flávia Milene, pelo auxílio e colaboração;

Aos meus amigos paraenses discentes na UFRPE: Moara, Jackeline, Claudeana e Luiz Henrique que me receberam de coração aberto e que formamos uma família longe de casa, a minha amiga Leticia, Emanuel, Matheus, Jose Garcetz e Guilherme pela amizade e companhia nos estudos;

Aos Senhores Fábio Rocha, Aldo Mostardi, Evandro Calixto, Francisco de Jesus e Olinda Oliveira da Estação Biológica da UnB pela colaboração nos trabalhos, mas também pela amizade que será eterna.

## SUMÁRIO

	Página
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>RESUMO GERAL</b> .....	vii
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	viii
<b>CAPÍTULO I - Introdução geral</b> .....	01
<b>1. A cultura do amendoim</b> .....	02
<b>2. Potyvírus e tospovírus que causam doenças no amendoim</b>	04
<b>1.1. Gênero <i>Potyvirus</i></b> .....	04
<b>1.2. Gênero <i>Tospovirus</i></b> .....	06
<b>3. Metagenômica</b> .....	08
<b>4. Referencias bibliográficas</b> .....	10
<b>CAPÍTULO II - DETECÇÃO DE VÍRUS EM AMENDOIM OBTIDOS EM ÁREAS PRODUTORAS DE SÃO PAULO</b> .....	18
<b>RESUMO</b> .....	19
<b>ABSTRACT</b> .....	19
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
<b>Obtenção e manutenção dos isolados virais</b> .....	21
<b>Gama de hospedeiros</b> .....	23
<b>Dot-ELISA</b> .....	23
<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	24
<b>Sequenciamento e análise de metagenômica</b> .....	25
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>Manutenção dos isolados virais e estudo de gama de hospedeiros</b> .....	26
<b>Dot-ELISA</b> .....	31
<b>Microscopia eletrônica</b> .....	32
<b>Sequenciamento e análise de metagenômica</b> .....	33
<b>CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	39

## RESUMO GERAL

O amendoim (*Arachis hypogaeae* L.) é uma oleaginosa pertencente à família *Fabaceae*, originária da América do Sul. Seus grãos são muito utilizados como fonte de alimento e na produção de óleo. Os principais países produtores são China, Índia e Estados Unidos, que ocupam o 1º, 2º e 3º lugar, respectivamente. O Brasil situa-se na 17ª posição, tendo o Estado de São Paulo contribuído com 95% da produção total do país. O amendoim é hospedeiro de um grande número de espécies de vírus, que limitam o desenvolvimento da cultura em diferentes partes do mundo. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de vírus em plantas de amendoim oriundas de 10 municípios paulistas, sendo analisadas amostras (am) de campos (cam) de **Santa Adélia** (3cam/6am), **Lusitânia** (1cam/1am), **Jaboticabal** (3cam/6am), **Itápolis** e **Pindorama** (1cam/2am, cada), **Tupã** (4cam/8am), **Rancharia** e **Marília** (1cam/2am, cada), **Guaimbê** (2cam/4am) e **Guarantã** (1cam/2am). Plantas de amendoim foram usadas para manutenção dos isolados virais, empregando-se transmissão sucessivas por meio de enxertias. Os isolados foram submetidos a análises biológicas em gama de hospedeiros, sorológicas pelo método Dot-ELISA e moleculares por RT-PCR e metagenômica. Os hospedeiros indicadores testado foram: *Lactuca sativa*, *Capisicum annuum*, *C. annuum* var. 679, *C. annuum* var. Ikeda, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiniana tabacum*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *Physalis floridana* e *Solanum sculentum*. Com base nos resultados do teste Dot-ELISA foi detectada a presença dos tospovírus *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (16am), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) (6am) e do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (3am). Ao ser comparado os resultados obtidos no sequenciamento (MacroGen) do fragmento obtido no teste RT-PCR, com as sequências disponíveis no GenBank, ficou comprovada ocorrência do GRSV. Por outro lado, a análise metagenômica confirmou a presença do GRSV e detectou o potyvírus *Peanut mottle virus* (PeMoV), ambos com genoma completo.

**Palavras-chaves:** *Arachis hypogaea*, Dot-ELISA, metagenômica, tospovírus e potyvírus.



## GENERAL ABSTRACT

The peanut (*Arachis hypogaea*) is an oleaginous plant belonging to the *Fabaceae* family, native to South America. Its kernels are widely used as a food source and the production of oil. The main producing countries are China, India and the United States, which occupy the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> places, respectively, in the ranking of world production. Brazil occupies the 17th position, in which the State of São Paulo stands out with 95% of total production of the country. The peanut is infected by several virus species, which limit the development of the crop in different parts of the world. The objective of this study was to detect the presence of virus in peanut plants in 10 counties of the State of São Paulo. Thirty-five samples (s) from 18 fields (f) were analyzed from **Santa Adélia** (3f/6s), **Lusitânia** (1f/1s), **Jaboticabal** (3f/6s), **Itápolis** e **Pindorama** (1f/2s, each), **Tupã** (4f/8s), **Rancharia** e **Marília** (1f/2s, each), **Guaimbê** (2f/4s) and **Guarantã** (1f/2s). The maintenance of the virus isolates was done in peanut plants graft inoculated. The isolates were submitted to biological, serological e molecular analyses. For host range study, *Lactuca sativa*, *Capisicum annuum*, *C. annuum* var. 679, *C. annuum* var. Ikeda, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiniana tabacum*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *Physalis floridana* and *Solanum sculentum* were mechanically inoculated and the symptoms analyzed. Based on Dot-ELISA results, the presence of the tospoviruses *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (16s), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) (6s) and do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (3s) was detected. The comparison of the sequence obtained in the RT-PCR test with those deposited in the GenBank, revealed the occurrence of the GRSV. Furthermore, the metagenomic analysis showed the presence of the GRSV, as well as, the potyvirus *Peanut mottle virus* (PeMoV), both with complete genome.

**Keywords:** *Arachis hypogaea*, Dot-ELISA, metagenômico, tospovirus e potyvirus.

## **CAPÍTULO I**

---

---

### **Introdução Geral**

# ANÁLISES BIOLÓGICAS, SOROLÓGICAS E MOLECULARES DE PLANTAS DE AMENDOIM INFECTADAS POR VÍRUS OBTIDAS EM ÁREAS PRODUTORAS DE SÃO PAULO

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. A cultura do amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa pertencente à família *Fabaceae* que possui grande capacidade de adaptação a clima e solo de regiões tropicais e subtropicais (Figura 1) (NAKAGAWA; ROSOLEM, 2011; ARAÚJO; DOLL; GUNTNER, 2006; AZEVEDO NETO et al., 2010).



**Figura 1.** Planta de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) mantida em casa de vegetação na Estação Experimental Biológica da Universidade de Brasília.

Várias denominações são atribuídas ao amendoim: jinguba, mancarra, mandobi, mandubi, mendubi, menduí, mindubi, mindubim, erdnub, maní, cacahuete, cacahuète, pistache de terre, peanut, groundnut, arachide, entre outros (PLANTAMED, 2010). Proveniente da América do Sul das regiões de GranChaco, Vales do Rio Paraná e Paraguai, Norte da Argentina e Peru, a espécie cultivada, *A. hypogaea*, apresenta uma estrutura de frutificação dotada de geotropismo positivo e que transporta a vagem na extremidade, denominada de ginóforo. Esta espécie é subdividida em duas subespécies, *A. hypogaea* subespécie *hypogaea*, que pertence ao tipo agrícola Virgínia e *A. hypogaea* subespécie *fastigiata*, pertencente aos tipos agrícolas Valência ou Spanish (VALLS, 2013).

A cultura do amendoim apresenta importância socioeconômica elevada por ofertar mão de obra nas áreas de produção agrícola, contribuindo com a fixação do homem no campo, além de fornecer um alimento com alto teor de proteína. O grão do amendoim é muito apreciado na alimentação humana, sendo consumido “in natura” e em produtos

industrializados na forma de doces, paçocas, chocolates, biscoitos, pastas, maionese, margarina, gordura hidrogenada e cremes (PATTEE, 2005). Outras aplicações do amendoim incluem: biocombustível, na indústria de cosméticos e farmacêutica, como diluente para diversos tipos de medicamentos, combustível para lâmpadas de operários de minas e como matéria-prima para a indústria de sabões e lubrificantes (CAMPESTRE, 2010). Além da parte aérea das plantas servirem como forrageira, com a extração do óleo dos grãos, o bagaço, também, é aproveitado na forma de torta (AZEVEDO NETO et al., 2010; NAKAGAWA; ROSOLEM, 2011).

Na composição dos grãos são encontrados cerca de 50% de óleo, 27 a 33% de proteína, assim como vitaminas e minerais essenciais (AZEVEDO NETO et al., 2010; NAKAGAWA; ROSOLEM, 2011; PATTEE, 2005). O óleo é composto por uma mistura de acilgliceróis, contendo uma alta proporção de ácidos graxos insaturados, em particular, o oleico (50 a 65%) e linoleico (18 a 30%) (PATTEE, 2005).

Entre as principais oleaginosas cultivadas no mundo, o amendoim se sobressai em área plantada e total de colheita de 24.709.458 de hectare(ha), obtendo uma produção total de 41.185.933 toneladas(t) (FAOSTAT, 2014). A China lidera o ranking da produção com 41,5% da produção mundial, seguida pela Índia com 18,2% e os Estados Unidos da América (EUA) com cerca de 6% perfazendo aproximadamente 57% da produção mundial.

Na China, 95% do que é produzido destina-se ao consumo interno e o restante segue para exportação, tendo como principais países importadores Holanda, Reino Unido, Canadá, Japão e Singapura (CONAB, 2013).

O Brasil ocupa o 17º lugar na produção mundial de amendoim, sendo o cultivo no país concentrado principalmente nas regiões Sudeste, Sul, destacando-se os estados de Minas Gerais, Paraná e São Paulo que são os maiores produtores (CONAB, 2013), sendo que o último é o que apresenta também maior financiamento para custeio das áreas de produção dessa cultura. A estimativa de produtividade do amendoim para 2014 foi de 3.499 kg/ha, com crescimento da produção em torno 15,9%, passando de 291,6, para 337,91 mil t (CONAB, 2013). Atualmente, São Paulo é responsável pela maior parte produção nacional de amendoim, sendo que o Brasil anualmente exporta 40% e os demais 60% são destinados para o consumo interno (CONAB, 2013).

Apesar da grande importância econômica do amendoim, existem muitos fatores que limitam a produção desta leguminosa. Dentre eles, as doenças ocasionadas por diferentes patógenos têm afetado severamente esta cultura em várias partes do mundo.

A magnitude das doenças do amendoim pode diferir com o local e a época de plantio (TASSO JUNIOR, 2004), sendo as manchas foliares, causadas por fungos, citadas como as mais importantes (PIO-RIBEIRO et al., 2013; TASSO JUNIOR, 2004). Entretanto, as viroses vêm sendo relatadas cada vez mais frequentes nesta cultura (DE BREUIL et al., 2007; PIO-RIBEIRO et al., 2013). A situação é agravada principalmente quando os agentes virais possuem formas de sobrevivência e vetores eficientes nas áreas de produção, ganhando destaque as epidemias iniciadas a partir de inóculo primário em plantas voluntárias (PIO-RIBEIRO et al., 2013).

## **2. Potyvírus e tospovírus que causam doenças no amendoim**

### **2.1. Gênero *Potyvirus***

O gênero *Potyvirus*, em número de espécies virais, é o maior da família *Potyviridae*, que por sua vez é a segunda maior família de vírus de plantas. Os vírus classificados nesta família causam doenças em várias culturas de clima tropical e temperado, anuais e perenes, como as hortaliças e as fruteiras, e também grandes culturas mono e dicotiledôneas.

Segundo Adams; King; Carstens (2013), a família *Potyviridae* está dividida em nove gêneros, sendo oito bem definidos (*Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*) e um gênero ainda não definido que agrupa duas espécies: *Spartina mottle virus* e o *Tomato mild mottle virus*. Esta família é constituída por mais de 150 espécies e possui a classificação baseada de acordo com o agente vetor e a organização do genoma.

Os membros da família *Potyviridae* formam corpos de inclusão no citoplasma das células infectadas. Estas inclusões cilíndricas também podem ser chamadas de estrutura em “cata-vento”, observadas em cortes ultrafinos, característica importante para detecção de potyvírus que se encontram distribuídos no mundo inteiro. A transmissão experimental de vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus* ocorre de maneira fácil de plantas infectadas para plantas saudáveis, através da inoculação mecânica de extrato vegetal infectado ou de preparações virais purificadas ou concentradas (ADAMS; KING; CARSTENS, 2013). Os sintomas característicos presentes nas plantas infectadas por espécies da família *Potyviridae* são o mosqueado, mosaico, clorose, necrose e deformação de frutos e folhas (SHUKLA et al., 1994).

A transmissão dos potyvírus é realizada por afídeos de forma não circulativa não persistente, mediada pela proteína auxiliar Hc-Pro (Helper component – protein) e CP (proteína capsidial) (DI PIERO et al., 2006). As espécies deste gênero possuem partículas alongadas, flexuosas com cerca de 680 a 900 nm de comprimento e cerca de 11 a 13 nm de diâmetro, com genoma constituído por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo com aproximadamente 10.000 nt. O RNA genômico é envolto por um capsídeo composto por cerca de 2.000 cópias da CP. O RNA dos potyvirus é ligado a uma proteína de origem viral VPg (genome-linked viral protein), na extremidade 5' e apresentando uma cauda poliadenilada, também denominada Poli (A) de origem viral na extremidade 3' (SOUMYA et al., 2014; URCUQUI-INCHIMA, HAENNI; BERNARDI, 2001). A VPg e a CP são os únicos produtos gênicos que constitui a partícula viral (SOUMYA et al., 2014; HOLLINGS; BRUNT, 1981).

Com a introdução de novos isolados de vírus e a propagação através de sementes ou por pulgão, perdas econômicas podem ocorrer na produção de amendoim. A espécie *Peanut mottle virus* (PeMoV), potyvirus, foi relatada pela primeira vez na cultura nos EUA (KUHN, 1965). Este vírus é considerado economicamente importante em nível mundial, por causar danos à cultura. Perdas na Georgia-USA devido a infecção causada pelo PeMoV foram estimadas em 6% e na Índia ocorrendo perdas que seriam de até 40%, em cultivares suscetíveis, resultando na diminuição da produção em cerca de 25% (KUHN, 1965; SOUMYA et al., 2014).

No Brasil, foi relatada a ocorrência de um vírus propagado por sementes de amendoim e pelo pulgão (COSTA; KITAJIMA, 1974) sendo considerada a primeira referência do PeMoV. Mais tarde, este patógeno foi detectado nos Estados da Paraíba e São Paulo (PIO-RIBEIRO et al., 2000; ANDRADE et al., 1996), em seguida, foi detectado em *A. pintoi* (ANJOS et al., 1998). Na maioria dos trabalhos a detecção desta espécie foi baseada no gene da capa proteica, sendo elucidado apenas duas sequências do genoma completo com depósito no GenBank (FLASINSKY; GONZALES; CASSIDY, 2009).

A estirpe *Peanut stripe* (PSt) foi descrita nos EUA como um novo vírus que entrou no país por meio de material contaminado originário da China (DEMSKI et al., 1984), com base em estudos moleculares realizados a nova classificação foi lançada, essa estirpe passou a pertencer ao *Bean common mosaic virus* (BCMV) denominada então como BCMV-PSt que é considerado um dos principais vírus do amendoim, por possuir uma ampla distribuição geográfica, devido a propagação ocorrer por sementes (DEMSKI et al., 1984; XU et al., 2013)

e pelas grandes perdas na produção, ocasionadas principalmente no continente asiático (DEMSKI et al., 1984). No Brasil, a presença deste vírus foi registrada, entretanto, o patógeno ficou limitado à coleção de germoplasma da Embrapa Algodão, de onde foi erradicado (PIO-RIBEIRO et al., 1996, 2000, 2013).

## 2.2. Gênero *Tospovirus*

O gênero *Tospovirus* está classificado na família *Bunyaviridae* e é o único desta família que é capaz de infectar plantas. As espécies do gênero são vírus transmitidas por tripes (*Trips* e *Frankliniella*) (MARGARIA et al., 2014; WIJKAMP et al., 1995; WILLIAMS-WOODWARD, 2010) e estabelecem um tipo de relação denominada circulativa propagativa.

As partículas de *Tospovirus* apresentam forma esférica, com 80-120nm de diâmetro, envelopadas com uma capa lipoproteica com projeções glicoproteicas de 5-10nm. O genoma consiste de três moléculas de RNAs de fita simples com 2,9kb, 4,9kb e 8,9kb, denominados segmentos L (Large), M (Medium) e S (Small), respectivamente. O segmento L RNA apresenta polaridade negativa e codifica para a proteína polimerase L. Os segmentos M e S RNA apresentam um arranjo ambisense, sendo que o M RNA codifica para o precursor das glicoproteínas Gn/Gc, envolvidas no processo de aquisição do vírus pelo vetor, e a proteína não estrutural NSm, com 33,6kDa, envolvida no movimento célula-a-célula (SOELLICK et al., 2000; WILLIAMS-WOODWARD, 2010). O segmento S RNA codifica para a proteína N do nucleocapsídeo e para a proteína não estrutural NSs, com 52,4kDa (DE HAAN, 1990; DE HAAN et al. 1991; KORMELINK et al.; 1994; MARGARIA et al. 2014; SNIPPE et al., 2007; STORMS et al, 1995; VAN REGENMORTEL et al., 2000).

O primeiro tospovírus relatado foi o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), em 1915, na Austrália na cultura do tomateiro (BRITTLEBANK, 1919). Esse gênero abrange espécies causadoras de doenças em uma ampla gama de plantas cultivadas e silvestres (DE BREUIL et al., 2007), incluindo várias de elevada importância econômica, como é o caso do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e pimenta (*Capsicum annuum* L.). As espécies *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e TSWV diferenciam-se entre si com base na sequência do gene N (DE ÁVILA et al., 1993; PIO-RIBEIRO, et al., 2013), entretanto, os sintomas causados por estas espécies possuem uma semelhança muito grande, tornando-se a distinção só por sintomatologia muito difícil (GRACIA et al, 1999; WILLIAMS-WOODWARD, 2010). Também no amendoim, as diferentes espécies até então relatadas, induzem sintomas semelhantes.

Os sintomas de GRSV e TSWV como de outros tospovírus que infectam plantas de amendoim são variados, incluindo desde anéis concêntricos, manchas cloróticas em folíolos, nanismo, descoloração, até quebra de sementes, com pouco dano, ao intenso nanismo e morte de toda planta, também sendo bastante reduzido o número de vagens produzidas, o tamanho de amêndoas e a produção por planta (GRACIA et al, 1999; WILLIAMS-WOODWARD, 2010).

O critério para distinguir espécies do gênero *Tospovirus*, baseou-se na divergência da sequência de aminoácidos da proteína do nucleocapsídeo (N), onde foi analisada uma alta divergência entre os isolados, pertencentes ao sorogrupo II, considerando como diferentes espécies inclusas no gênero *Tospovirus*, sugerindo os nomes TCSV e GRSV, respectivamente (DE AVILA et al., 1993). De acordo com o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 23 espécies definitivas de tospovírus são reconhecidas, existindo espécies tentativa (DE OLIVEIRA et al., 2011; HASSANI-MEHRABAN et al., 2011; SEEPIBAN et al., 2011; ZHOU et al., 2011).

A espécie TSWV vem sendo considerada como uma das mais importantes espécies virais que afetam a produção de amendoim no sudeste dos Estados Unidos (CULBREATH; SRINIVASAN, 2011; RILEY et al., 2011). Ocorrências deste vírus e de outros tospovírus em amendoim têm sido relatadas em outras partes do mundo inclusive no Brasil (ANDRADE et al., 1996; SHRESTHA et al., 2013). Recentemente, o GRSV foi relatado em tomate na Flórida, Estados Unidos (WEBSTER et al., 2014).

Nos Estados Unidos, o vira-cabeça do amendoim foi relatado pela primeira vez em 1971 (HALLIWELL; PHILLEY, 1974; SHRESTHA et al., 2013). Desde então se tornou uma das doenças mais graves da cultura no país, com destaque nos Estados do Alabama (HAGAN et al., 1990), Florida, Mississippi (REED; SUKAMTO, 1995) e na Georgia (CULBREATH; TODDY; BROWN, 2003; TODD et al., 1995), em torno da década de 90, foram registradas perdas significativas acima de 40% na cultura (HADDEN, 1991; RILEY et al., 2011. No sul do Texas neste período foram observadas perdas quase totais em alguns campos (BLACK et al., 1986; RILEY et al., 2011).

Embora o impacto do vira-cabeça do amendoim em áreas de produção do Brasil não tenha sido tão significativo, quando comparado com os danos ocorridos na América do Norte (ANDRADE et al., 1996; SHRESTHA et al., 2013) existem registros de alta incidência do TSWV em áreas experimentais do Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo com perdas acentuadas (COSTA, 1941; LOVATO et al., 2004; SHRESTHA et al., 2013).



Em Itápolis, também em São Paulo, Camelo-García et al. (2014) relataram a ocorrência de GRSV com incidência elevada (cerca de 70%) de plantas infectadas que apresentaram redução no número de vagens.

Nagata et al. (1995) realizaram um levantamento da ocorrência de tospovírus em diferentes hospedeiros, abrangendo vários estados brasileiros e relataram que em São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul predominavam as espécies TCSV e GRSV (ANDRADE et al., 2005), enquanto no Distrito Federal e no Paraná predominava a espécie TSWV.

### 3. Metagenômica

Novas tecnologias de sequenciamento e a redução considerável dos custos vêm permitindo avanços na obtenção de informações biológicas diretamente de comunidades microbianas em seu habitat natural. Uma dessas tecnologias é a metagenômica, que contribui significativamente para o conhecimento da biodiversidade microbiana. Hoje é possível realizar estudos em dezenas de espécies de uma só vez, através dos dados obtidos pela análise do seu metagenoma (KUNIN et al., 2008; PIROVATO et al., 2015; ROOSSINCK et al., 2010).

A metagenômica é uma derivação da genômica microbiana original, tendo como principal diferença a obtenção ou não de culturas puras para as análises. No caso da metagenômica, não é necessário obter culturas puras para que o sequenciamento seja realizado. Incluindo uma diversidade muito grande de técnicas e enfoques que podem ajudar a estabelecer hipóteses referentes a interações entre membros de comunidades e de interações com seus ambientes, é também capaz de oferecer modos de aperfeiçoar as estratégias de análises de um dado ecossistema e expandir o conhecimento sobre o relacionamento da gama de espécies de uma comunidade microbiana (KUNIN et al., 2008; ROOSSINCK et al., 2010).

Em estudos de metagenômica são observadas as seguintes fases: amostragem e coleção de dados, seguidos pela extração de DNA/RNA, o sequenciamento, processamento das sequências também chamado de *reads* e montagem. Os *reads* ou *contigs* estão atrelados ao processo de predição de genes e anotação, finalizado com a aplicação de um passo de classificação (KUNIN et al., 2008; ROOSSINCK et al., 2010). A classificação consiste na atribuição de uma espécie, ou de um grupo taxonômico da mais alta ordem a cada *read* da amostra na tentativa de caracterizar o ecossistema em termos da composição e consequentemente em termos das interações entre os organismos presentes (PIROVATO et al., 2015).

Na literatura há uma variedade considerável de métodos de classificação, e são divididos em dois grupos, de acordo com o enfoque utilizado: métodos fundamentados em similaridade de sequências e em composição de sequências. Na primeira categoria, a classificação é feita com base na similaridade de sequências e no uso de programas de análises de sequências, como o Blast (ALTSCHUL et al., 1997), para classificar um *read* de acordo com *hits* localizados em base de dados de DNA (proteínas) ou domínios. Na segunda categoria, os métodos contam com o fato de que distintos genomas podem diferir na assinatura e na composição, nos quais se pode citar o conteúdo GC, frequência de oligonucleotídeos, a presença ou ausência de genes marcadores específicos, tais como o RNA ribossomal 16S. A montagem de *reads* em *contigs* para futuras comparações também é muito utilizada (KUNIN et al., 2008; ROOSSINCK et al., 2010).

Diversos estudos têm utilizado análises de metagenômica para avaliação de biodiversidade, onde são analisadas amostras ambientais para as sequências de vírus, entretanto, os virologistas de plantas têm usado uma abordagem diferente, através da análise individual das plantas amostradas (ROOSSINCK et al., 2010).

Na lista do ICTV, consta cerca de 900 espécies de vírus de plantas. Estudos preliminares de plantas selvagens indicam que milhares de novos vírus estão ainda para ser descobertos (ADAMS; KING; CARSTENS, 2013; ROOSSINCK et al, 2010; ROOSSINCK 2012). Vírus de plantas persistentes, que têm sido pouco estudados e que tem fenótipos consideravelmente pouco conhecidos, constituem cerca da metade de todos os vírus encontrados em plantas selvagens (MIN et al., 2012).

A importância desta técnica na virologia vegetal é fortemente elevada, já que em estudos de metagenômica recentes foram detectadas partículas de vírus de plantas em fezes de seres humanos e de outros mamíferos, em água do mar e doce, solo de plantações de arroz, e insetos que se alimentam de plantas (PRABHA et al., 2013; ROOSSINCK et al., 2010).

Com o objetivo de detectar a presença de vírus em plantas de amendoim oriundas de campos comerciais do Estado de São Paulo foi desenvolvido o presente trabalho, empregando-se diferentes metodologias.

#### 4. Referências bibliográficas

- ADAMS, M. J.; KING, A. M. Q. CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). **Archives of Virology**, New York, v.158. p. 2023-2030, 2013.
- ALTSCHUL, S.; MADDEN , F. T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLEL, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Reserch**, Oxford, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ANDRADE, G. P.; PIO-RIBEIRO, G.; GODOY, I. J.; SANTOS, R. C.; REDDY, D. V. R.; OLIVEIRA, L. M. B. Infecções simples e mista do *Peanut mottle potyvirus* e do *Tomato spotted wilt virus* em campos de amendoim no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 421- 1996.
- ANDRADE, G. P.; PIO-RIBEIRO, G.; SOUZA-DIAS, J. A. C.; COLARICCIO, D.; GODOY, I. J.; DOMINGOS, C. A.; CHAGAS, C. M. TCSV infectando amendoim em São Paulo: levantamento e caracterização. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 185-192, 2005.
- ANJOS, J. R. N.; KITAJIMA, E. W.; CHARCHAR, M. J. A.; MARINHO, V. L. A. Infecção natural de *Arachis pintoi* por "Peanut mottle virus" no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 23, p. 71-74, 1998.
- ARAÚJO, J. C.; DOLL, D.; GUNTNER, A. Water scarcity under scenarios for global climate change and regional development in semiarid northeastern Brazil. **Water International**, Illinois, v. 29, n. 2, p. 209-220, 2006.
- AZEVEDO NETO, A. D.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C. Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit. **Journal of Plant Interactions**, United Kingdom, v.5, p.1-10, 2010.
- BLACK, M. C.; LUMMUS, P. F.; SMITH, D. H.; DEMSKI, J. W. An epidemic of spotted wilt disease in south Texas peanuts in 1985. **Proceedings American Peanut Research**, Georgia, v. 18, p. 66, 1986.

BRITTLEBANK, C. C. Tomato diseases. **Journal Agriculture Victoria**, Georgia v. 17, p. 231–235, 1919.

CAMELO-GARCÍA, V, M.; LIMA, E. F. B.; MANSILLA-CÓRDOVA, P. J.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W.; BARRETO, M. Occurrence of Groundnut ringspot virus on Brazilian peanut crops. **Journal of General Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda, v. 80, p. 282-286, 2014.

CAMPESTRE- Indústria e companhia de óleos vegetais Ltda. 2010. Disponível em:<<http://www.campestre.com.br/oleo-de-amendoim.shtml>> Acesso: 16 agos. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/13– **Terceiro Levantamento Dezembro/2013**, disponivelem:<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_12\\_10\\_16\\_06\\_56\\_boletim\\_portugues\\_dezembro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_10_16_06_56_boletim_portugues_dezembro_2013.pdf)>Acesso em: 10 jun. 2014.

COSTA, A.S. Uma moléstia de vírus de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). A mancha anular. **O Biológico**, São Paulo, v.7, p.249-251,1941.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W. Mosaico do amendoim, uma doença de vírus transmitido por semente e por afídeo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 9, p. 48, 1974.

CULBREATH, A. K.; TODDY, J. W.; BROWN, S. L. Epidemiology and management of tomato spotted wilt in peanut. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 53–75, 2003.

CULBREATH, A. K.; SRINIVASAN, R. Epidemiology of spotted wilt disease of peanut caused by *Tomato spotted wilt virus* in the southeastern U.S. **Virus Research**, Amsterdam, v. 159, p. 101–109, 2011.

DE AVILA, A. C.; DE HAAN P.; KORMELINK R.; RESENDE, R. D. E O.; GOLDBACH, R. W.; PETERS, D. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. **Journal of General Virology**, London, v. 74, p. 153-9, 1993.

DE BREUIL, V.;ABAD, J.A.; NOME, C.F.; GIOLITTI, F. J.; LAMBERTINI, P.L.; LENARDON, S. *Groundnut ringspot virus*: an emerging *Tospovirus* inducing disease in peanut crops. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 251–254, 2007.

DE HAAN, P. The S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. **Journal of General Virology**, London, v. 71, p. 1001, 1990.

DE HAAN, P.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.O.; VAN POELWIJK, F.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. W. *Tomato Spotted wilt virus* L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal of General Virology**, London, v. 72, n.10, p. 2207-2216, 1991.

DE OLIVEIRA A. S.; BERTRAN A.G.M.; INOUE-NAGATA A. K.; NAGATA T, KITAJIMA E.W.; RESENDE R.O. An RNA-dependent RNA polymerase gene of a distinct Brazilian tospovirus. **Virus Genes**, Boston, v. 43, p. 385-389, 2011.

DEMSKI, J. W.; REDDY, D.V. R.; SOWELL, G. J. R.; BAYS, D. Peanut stripe virus a new seed-borne potyvirus from China infecting groundnut (*Arachis hypogaea*). **Annals of Applied Biology**, London, v. 105, p. 495-501, 1984.

DI PIERO, R. M.; REZENDE, J. A. M.; YUKI, V. A.; PASCHOLATI, S. F.; DELFINO, M. A. Transmission do Passion fruit woodiness virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização do maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p. 139-140, 2006.

FAOSTAT. Base estatística de dados sobre volume de produção, área colhida e produtividade agrícola de culturas no mundo, no ano base de 2012. Nova York, 2014. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 17 abril. 2014.

FLASINSKI, S.; GONZALES, R. A.; CASSIDY, B. G. The complete nucleotide sequence of Peanut mottle virus (M strain genomic RNA). **National Center for Biotechnology**, Bethesda, p. 2009.

GRACIA, O.; DE BORBON, C. M.; DE MILLAN, N. G.; CUESTA, G. V. Occurrence of different tospoviruses in vegetable crops in Argentina. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 223-227, 1999.

HADDEN, J. F. Georgia plant disease loss estimates 1990. University of Georgia Cooperation Extension Service. **Pub Pathology**, p. 91-105, 1991.

HAGAN, A. K.; WEEKS, J. R.; FRENCH, J. C.; GUDAUSKAS, R. T.; MULLEN, J. M. Tomato spotted wilt virus in peanut in Alabama. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, p. 615, 1990.

HALLIWELL R.; S, PHILLEY G. Spotted wilt of peanut in Texas. **Plant Disease Reporter** Washington, D.C., v. 58, p. 23–25, 1974.

HASSANI-MEHRABAN, A.; CHEEWACHAIWIT, S.; RELEVANTE, C.; KORMELINK, R.; PETERS, D. *Tomato necrotic ring virus* (TNRV), a recently described tospovirus species infecting tomato and pepper in Thailand. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 130, n. 4, p. 449-456, 2011.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. Potyviruses. In: DURSTK, E. (Ed.) **Handbook of Plant Virus Infections: Comparative diagnosis**. Elsevier, Amsterdam. p.731-799, 1981.

KORMELINK, R.; STORMS, M.; VAN LENT, J.; PETERS, D.; GOLDBACH, R. Expression and subcellular location of the NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology**, New York, v. 200, p. 56-65, 1994.

KUHN, C. W. Symptomatology, host range and effect on yield of a seed transmitted peanut virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.55, p. 880-884, 1965.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology**. Washington, p. 557-578, 2008.

LOVATO, F. A.; NAGATA, T.; RESENDE, R. O.; DE ÁVILA, A. C.; INOUE-NAGATA, A. K. Sequence analysis of the glycoproteins of Tomato chlorotic spot virus and Groundnut ringspot virus and comparison with other Tospoviruses. **Virus Genes**, Boston, v. 29, p. 321–328, 2004.

MARGARIA P, BOSCO L, VALLINO M, CIUFFO M, MAUTINO GC, TAVELLA L, TURINA M. The NSs protein of Tomato spotted wilt virus is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Virology**, v. 88, p. 5788–5802, 2014.

MIN, B. E.; FELDMAN, T. S.; ALI, A.; WILEY, G.; MUTHUKUMAR, V. Caracterização molecular, ecologia e epidemiologia de um romance Tymovirus em *viridis Asclepia* de Oklahoma. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, p. 166-176, 2012.

NAGATA, T.; ÁVILA, A. C.; TAVARES, P.C.T.M.; BARBOSA, C. J.; JULIATTI, F. C.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência de diferentes tospovírus em seis estados do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 90-95, 1995.

NAKAGAWA, J; ROSOLEM, C. A. **Amendoim: tecnologia de produção**. Botucatu, FEAPAF. p. 325, 2011.

PATTEE, H.E. Peanut oil.. In F. SHAHIDI (ed.) **Bailey's industrial oil and fat products**. New Jersey, USA, p. 431-463, 2005.

PIO-RIBEIRO, G; ANDRADE, G. P; MORAES, S. A.; MELO FILHO, P.A. Principais doenças do amendoim e seu controle. In: SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. 2. Ed. Brasília: Embrapa, p. 255-332, 2013.

PIO-RIBEIRO, G.; PAPPU, S. S.; PAPPU, H. R.; ANDRADE, G. P.; REDDY, D. V. R. Occurrence of cowpea aphid-borne mosaic virus in peanut in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n.7, p. 760-766, 2000.

PIO-RIBEIRO, G; SANTOS, R. C.; ANDRADE, G. P; ASSIS FILHO, F. M.; KITAJIMA, E. W.; OLIVEIRA, F. C.; PADOVAN, I. P.; DEMSKI, J.W. Isolamento e erradicação do peanut stripe virus no estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 289-291, 1996.

PIROVATO W.; MIOZZI, L.; BOETZER, M.; PANTALEO, V. Bioinformatics approaches for viral metagenomics in plants using short RNAs: model case of study and application to a *Cicer arietinum* population. **Frontier Microbiology**, p. 790-803, 2015.

PLANTAMED. <http://www.fitoterapica.com.br/plantaservas/especies/indexamaz.html>,2010. Acesso em 29 de dezembro, 2013.

PRABHA, K.; BARANWAL, V. K.; JAIN, R. K. Application of Next Generation High throughput sequencing technologies in characterization, Discovery and molecular interaction of plant viruses. **Indian Journal of Virology**, India, v. 24, n. 2, p. 157-165, 2013.

REED, J.T.; SUKAMTO, S. Thrips and tomato spotted wilt virus in a Mississippi peanut field. In: PARKER, B.; SKINNER, M.; LEWIS, T. (Eds.). **Thrips Biology and Management**. Plenum Press, New York, p. 453–460, 1995.

- RILEY, D. G.; JOSEPH, S. V.; SRINIVASAN, R.; DIFFIE, S. Thrips vector of topoviruses. **Journal of integrated pest management**, Illinois, v. 2, p. 1-10, 2011.
- ROOSSINCK, M. J. Metagenomics Virus Plant: Biodiversity and ecology. **Annual Review Genetical**, Palo Alto, v. 46, p. 357-367, 2012.
- ROOSSINCK, M. J.; SAHA, P.; WILEY, G. B.; QUAN, J. Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. **Molecular Ecology**, Germany, v. 19, p. 81-88, 2010.
- SEEPIBAN, C.; GAJANANDANA, O.; ATTATHOM, T.; ATTATHOM, S. *Tomato necrotic ring spot* virus, a new tospovirus isolated in Thailand. **Archives of Virology**, New York, v. 156, p. 263-674, 2011.
- SHRESTHA, A.; SRINIVASAN, R.; SUNDARAJ, S.; CULBREATH, A. K.; RILEY, D. G. Second generation peanut genotypes resistant to thrips-transmitted tomato spotted wilt virus exhibits tolerance rather than true resistance and differentially affect thrips fitness. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 2, p. 587-596, 2013.
- SHUKLA, D. D.; LAURICELLA, R.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. *The Potyviridae*. Wallingford, UK: **Common Agricultural Bureaux International** - (CAB International) Wallingford, UK, p. 516-516, 1994.
- SNIPPE, M.; SMEENK, L.; GOLDBACH, R.; KORMELINK, R. The cytoplasmic domain of tomato spotted wilt virus Gn glycoprotein is required for Golgi localization and interaction with Gc. **Virology**. New York, v. 363, p. 272-279. 2007.
- SOELLICK, T. R.; UHRIG, J. F.; BUCHER, G. L.; KELLMANN, J. W.; SCHREIER, P. H. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Washington, v. 97, p. 2373–2378, 2000.
- SOUMYA, K.; YOGITA, M.; PRASANTHI, Y.; ANITHA, K.; KAVI KISHOR, P. B.; JAIN, R. K.; BIKASH MANDAL. Molecular characterization of India isolate of Peanut mottle virus and immunodiagnosis using bacterial expressed core capsid protein. **Virus Disease**, India, v. 5, p. 331-337, 2014.



STORMS, M. M.; KORMELINK, R.; PETERS, D.; VAN LENT, J. W.; GOLDBACH, R. W. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. **Virology**, New York, v. 214, p. 485-493, 1995.

TASSO JUNIOR, L. C. Cultura do amendoim. In: MARQUES, O. M.; NOGUEIRA, G. A. (Eds.) **Pragas do Amendoim**. São Paulo: UNESP: Ed. Jaboticabal, p.1-220, 2004.

TODD, J. W.; CULBREATH, A. K.; CHAMBERLIN, J. R.; BESHEAR, R. J.; MULLINIX, B. G. Colonization and population dynamics of thrips in peanuts in the southern United States, In PARKER, B. L.; SKINNER, M.; LEWIS, T. (eds) **Thrips Biology and Management**, Plenum Press, New York, p. 453-460, 1995.

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

VALLS, J. F. M. Recursos genéticos do gênero *Arachis*. In: SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. 2a. Ed. Brasília: Embrapa, p. 45-70, 2013.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D.H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; McGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R.B. Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. **Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, California, USA. 2000.

WEBSTER, C.G.; PERRY, K. L.; LU, X.; HORSMAN, L.; FRANTZ, G.; MELLINGER, C.; ADKINS, S. First report of *Groundnut ringspot virus* infecting tomato in south Florida Online. **Plant Health Program** (2010), acesso em: dezembro/2014.

WIJKAMP, I.; ALMARZA, N.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 1069-1074, 1995.

WILLIAMS-WOODWARD, J. L. Georgia plant disease loss estimate. **University of Georgia Cooperative extension**. Annual publication. 2010.102p.

XU, M.; GAO, F; YANG, J.; WU, J.; XIE, L.; CHI, Y. Complete genome sequence of Peanut stripe virus isolated in China. **Journal of Phytopathology**, v. 162, p. 829-832, 2014.

ZHOU, J.; KANTARTZI, S. K.; WEN, R. H; NEWMAN, M.; HAJIMORAD, M. R.; RUPE, J.C.; TZANETAKIS, I. E. Molecular characterization of a new tospovirus infecting soybean. **Virus Genes**, Norwell, Massachusetts, v. 43, n. 2, p. 289-295, 2011.

## **CAPÍTULO II**

---

### **DETECÇÃO DE VÍRUS EM AMENDOIM OBTIDOS EM ÁREAS PRODUTORAS DE SÃO PAULO**

## 1     **DETECÇÃO DE VÍRUS EM AMENDOIM OBTIDOS EM ÁREAS PRODUTORAS** 2     **DE SÃO PAULO**

3     Michelle B. Pantoja<sup>1</sup>, Caroline A. Souza<sup>1</sup>; João F. Santos<sup>2</sup>, Ignácio J. Godoy<sup>2</sup>, Priscilla M. G. Costa<sup>1</sup>, Priscila G.  
4     A. Ferreira<sup>1</sup>, Mariana Martins<sup>3</sup>, Rosana Blawid<sup>3</sup>, Renato O. Resende<sup>3</sup>; Fernando L. Melo, Genira P.  
5     Andrade<sup>1</sup>, Gilvan Pio-Ribeiro<sup>1</sup>, Rita C. Pereira-Carvalho<sup>3</sup>

6     **RESUMO-** O amendoim (*Arachis hypogaea*), espécie da família *Fabaceae*, é uma fonte de  
7     alimentos e de óleo. As viroses vêm preocupando produtores em diferentes países, como  
8     China, Índia e Estados Unidos, que são os três principais produtores. No Brasil, esta cultura  
9     encontra-se em grande escala no Estado de São Paulo, onde doenças de etiologia viral vêm  
10    comprometendo a produção. Foram analisadas 35 amostras exibindo sintomas típicos de  
11    tospovírus, oriundas de 10 municípios paulistas. Inicialmente, foram inoculadas  
12    mecanicamente e por enxertia em amendoim e testadas por Dot-ELISA. Os 35 isolados foram  
13    mantidos em casa de vegetação em plantas de amendoim enxertadas, dos quais 18 foram  
14    selecionados e inoculados em *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Capsicum annuum*, *C.*  
15    *annuum* var. 679, *C. annuum* var. Ikeda, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Lactuca*  
16    *sativa*, *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *Physalis floridana* e  
17    *Solanum lycopersicum*. Para três isolados selecionados, foram feitas observações ao  
18    microscópio eletrônico de transmissão (MET). Os resultados do teste Dot-ELISA das 35  
19    amostras evidenciaram a ocorrência de *Groundnut ring spot virus* (GRSV), *Tomato spotted*  
20    *wilt* (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) em 16, 3, 6, respectivamente, com  
21    infecção simples ou mista. Plantas de todas as espécies incluídas na gama de hospedeiros  
22    exibiram sintomas e reação positiva no teste Dot-ELISA. Das três amostras observadas ao  
23    MET partículas típicas de tospovírus foram visualizadas. Em teste RT-PCR foi constatada a  
24    presença do tospovírus GRSV e a análise de metagenômica detectou, além do GRSV, o  
25    potivírus *Peanut mottle virus* (PeMoV), ambos com genoma completo.

26    **Palavra chave:** potyvírus, tospovírus, Dot-ELISA, metagenômica

27    **ABSTRACT-** The peanut (*Arachis hypogaea*) is an oleaginous plant of *Fabaceae* family,  
28    which has a significant importance, used as a food source and for obtaining oil. The  
29    occurrence of virus diseases in this crop has caused concern to growers in different countries  
30    like China, India and the United States, the top three world producers. In Brazil, the peanut  
31    crop is present in large scale in the State of São Paulo and diseases of viral origin have  
32    affected the production. Thirty-five samples of peanut exhibiting tospovirus symptoms,  
33    collected in 10 counties, were analyzed. The isolates were maintained under greenhouse  
34    conditions in grafted peanut plants and tested by Dot-ELISA. Afterwards, 18 isolates were

35 mechanical inoculated in *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Capisicum annuum*, *C.*  
36 *annuum* var. 679, *C. annuum* var. Ikeda, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Lactuca*  
37 *sativa*, *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *Physalis floridana* and  
38 *Solanum lycopersicum*. Three selected isolates were observed by transmission electron  
39 microscopy (TEM). The results of the Dot-ELISA of the 35 samples showed the occurrence  
40 of *Groundnut ring spot virus* (GRSV), *Tomato spotted wilt* (TSWV) and *Tomato chlorotic*  
41 *spot virus* (TCSV) in 16, 3 and 6, respectively. Plants of all species of the host range exhibited  
42 symptoms and positive reaction in Dot-ELISA. In the three samples observed by TEM,  
43 typical particles of tospoviruses were visualized. In RT-PCR test, the presence of the  
44 tospovirus GRSV was observed, and the metagenomic analyzes detected GRSV and the  
45 potyvirus *Peanut mottle virus* (PeMoV), both with complete genome.

46 **Keyword:** potyvirus, tospovirus, Dot-ELISA, metagenomic

## 47 INTRODUÇÃO

48 O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma planta com origem na América do Sul,  
49 sendo considerada uma das principais oleaginosas do mundo. O gênero *Arachis* está  
50 classificado na família *Fabaceae*, subfamília *Papilionideae* (BERTIOLI, et al., 2011).

51 O grão é o principal produto econômico do amendoim, rico em lipídios, proteínas,  
52 vitamina E e do complexo B. Possui um sabor agradável, sendo destinado principalmente ao  
53 consumo “in natura”, como aperitivos, salgados e doces. Pelo seu alto teor de lipídios, os  
54 grãos também são destinados à indústria para obtenção de óleo (NAKAGAWA; ROSELEM,  
55 2011).

56 Apesar de o amendoim possuir um grande potencial no mercado para diversos fins, há  
57 uma série de fatores que dificultam a produção. Dentre estes, vírus pertencentes aos gêneros  
58 *Potyvirus* e *Tospovirus* têm causado grandes perdas econômicas nesta cultura (PIO-RIBEIRO  
59 et al., 2000; 2013).

60 O *Peanut mottle virus* (PeMoV) foi primeiro relatado em amendoim nos Estados  
61 Unidos (KUHN 1965). No Brasil, Kitajima (1986) referiu-se a esse vírus como “peanut  
62 mosaic” e Andrade et al. (1996); Pio-Ribeiro et al. (2000) detectaram esse potyvírus  
63 infectando amendoim em São Paulo e na Paraíba. Anjos et al. (1998) relataram a mesma  
64 espécie em *A. pintoii* no Brasil Central. Soumya et al. (2014) caracterizaram um isolado de  
65 PeMoV, obtido de amendoim no sul da Índia, com base em reações do hospedeiro e

66 sequenciamento do gene da proteína capsidial (*CP*), revelando ser o isolado indiano muito  
67 próximo filogeneticamente de um isolado de amendoim relatado em Israel e distinto de um  
68 isolado de ervilha (*Pisum sativum* L.) dos Estados Unidos (KING et al., 2011).

69 A primeira espécie do gênero *Tospovirus* descrita foi o *Tomato spotted wilt virus*  
70 (TSWV) em 1915, na Austrália, em plantações de tomate (BRITTLEBANK, 1919). Esse  
71 gênero está classificado na família *Bunyaviridae* sendo o único capaz de infectar plantas. Os  
72 tospovírus possuem partículas esféricas, com 80-120nm de diâmetro, envelopadas com uma  
73 capa lipoproteica e são transmitidos por um número limitado de tripes em uma relação  
74 caracterizada como circulativa propagativa (RILEY et al., 2011).

75 Os tospovírus TSWV, *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e o *Tomato chlorotic spot*  
76 *virus* (TCSV) vêm sendo relatados no amendoim em diversas regiões do mundo, causando  
77 danos significativos a essa planta (ANDRADE et al., 2005; CULBREATH; SRINIVASAN,  
78 2011; CAMELO-GARCÍA et al., 2014; DE ÁVILA et al., 1993; DE BREUIL et al., 2007).

79 O TSWV causa danos severos em áreas comerciais de amendoim desde a década de 70  
80 nos Estados Unidos (BLACK et al., 1986; HALLIWELL; PHILEY, 1974) com reduções na  
81 produção de até 95%. A incidência desta virose tornou-se cada vez mais comum a partir dos  
82 anos 1990 e causou uma perda média anual de 12,3 milhões de dólares (BLACK et al., 1986;  
83 CULBREATH et al., 1992; RILEY et al., 2011).

84 No Brasil, o primeiro relato de tospovírus em amendoim foi realizado em 1941 com a  
85 descrição da ocorrência do agente causal da mancha anular (COSTA; KITAJIMA, 1941).  
86 Outros registros foram efetuados (ANDRADE et al., 1996; 2005) e, recentemente, foi  
87 detectada a presença do GRSV infectando plantas de amendoim no estado de São Paulo  
88 (CAMELO-GARCIA et al., 2014).

89 O objetivo desse trabalho foi realizar análises biológicas, sorológicas e moleculares em  
90 amostras coletadas em áreas comerciais de amendoim no estado de São Paulo, visando  
91 detectar quais espécies de vírus que estavam causando doença.

## 92 MATERIAL E MÉTODOS

### 93 Obtenção e manutenção dos isolados virais

94 A coleta de 35 amostras de amendoim, apresentando sintomas típicos de vírus, foi realizada  
95 em 18 campos de 10 municípios do estado de São Paulo (Tabela 1), as quais foram analisadas

96 inicialmente na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por meio de inoculação  
 97 mecânica (Figura 1A) e por enxertia em amendoim. Uma vez obtidos os respectivos isolados  
 98 virais, seguiu-se com o envio para Universidade de Brasília – UnB, onde foram mantidos  
 99 igualmente em amendoim, por enxertia, na Estação Experimental de Biologia - (EEB) da UnB  
 100 (Figura 1 B e C) até o uso em testes biológicos, sorológicos e moleculares.

101 **Tabela 1.** Amostras de amendoim coletadas em campos comerciais de diferentes municípios de São Paulo,  
 102 listadas abaixo com indicativo dos locais da coleta, números e códigos dos campos e números e códigos dos  
 103 isolados virais

Municípios em que se realizaram as coletas	Números e códigos dos campos	Números* e códigos dos isolados
Santa Adélia	3 (A, B, C)	6- (A1, A2, B1, B2, C1; C2)
Luzitânia	1 (D)	1- (D1)
Jaboticabal	3 (E, F, G)	6- (E1, E2 F1, F2, G1, G2)
Itápolis	1 (H)	2- (H1, H2)
Pindorama	1 (I)	2- (I1, I2)
Tupã	2 (K, L)	4- (K1, K2, L1, L2)
Rancharia	1 (M)	2- (M1, M2)
Tupã	2 (N, O)	4- (N1, N2, O1, O2)
Marília	1(P)	2- (P1, P2)
Guaimbê	2 (Q, R)	4- (Q1, Q2, R1, R2)
Guarantã	1 (S)	2- (S1, S2)

104 \*Os números correspondem às amostras das quais foram obtidos e analisados os isolados virais.



105  
 106 **Figura 1.** Plantas de amendoim em casa de vegetação para manutenção dos isolados virais. **A-** Plantas  
 107 inoculadas mecanicamente-UFRPE; **B-** Detalhe da enxertia-UnB; e **C-** plantas inoculadas por enxertia-  
 108 UnB.

109  
 110 Plantas de amendoim não inoculadas foram mantidas para a utilização como controles  
 111 negativos. A inoculação mecânica foi realizada com extrato foliar de plantas infectadas, na  
 112 concentração 1:20 (p/v), em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio e Celite  
 113 a 1%, o qual foi mantido em banho de gelo até o momento da utilização. Para observação dos  
 114 sintomas, por meio de análises visuais, foram realizadas leituras aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias  
 115 após inoculação (dai), verificando-se os tipos de reação das plantas resultantes de infecção

116 local e/ou sistêmica. Os isolados também foram mantidos por enxertia do topo da planta,  
117 realizada com o uso de estacas de amendoim com sintomas como “cavaleiro”. O corte das  
118 estacas, que ficou em contato com o “cavalo”, foi realizado em bisel, introduzido em uma  
119 incisão no topo da planta e firmado com parafilm. As leituras para avaliação dos sintomas  
120 foram realizadas até trinta dias.

### 121 **Gama de hospedeiros**

122 Para análise, por meio de reações em hospedeiros indicadores de vírus, foram  
123 selecionados 18 isolados mantidos em casa de vegetação e inoculados mecanicamente em  
124 plantas de *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Capsicum annuum*, *C. annuum* var. 679,  
125 *C. annuum* var. Ikeda, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Lactuca sativa*, *Nicotiana*  
126 *tabacum*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *Physalis floridana* e *Solanum*  
127 *lycopersicum*. Os procedimentos para a inoculação mecânica foram os descritos anteriormente  
128 e as avaliações realizadas aos 3, 5, 7, 14, 21 e 30 dias. Por ocasião da última avaliação,  
129 amostras foliares de brotações de todas as plantas foram coletadas para a realização do teste  
130 Dot-ELISA.

### 131 **Dot-ELISA**

132 Foram realizados dois testes sorológicos Dot-ELISA utilizando-se membrana de  
133 Nitrocelulose Hybond C.

134 No primeiro, foram empregados antissoros contra GRSV, TCSV e TSWV. De cada  
135 um dos 35 isolados, três discos de aproximadamente 0,25mg foram retirados de brotações de  
136 plantas com sintomas e macerados em nitrogênio líquido em um tubo de microcentrífuga do  
137 tipo eppendorf. Adicionou-se 1mL da solução tampão PBS-1x, com 0,1% de sulfito de sódio  
138 para obtenção do extrato bruto utilizado para preparar as diluições das amostras na proporção  
139 de 1:10 p/v. As amostras foram centrifugadas e 2 $\mu$ L do sobrenadante foram aplicados em  
140 quadrículos demarcados na membrana. Após a secagem, a membrana, foi tratada com a  
141 solução de bloqueio PBS-Tween 2% (PBS-T) + 5% p/v de leite desnatado, ficando em  
142 temperatura ambiente por uma hora sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi  
143 lavada três vezes com 10mL de PBS-T, 10 minutos por vez, tratadas com anticorpo policlonal  
144 contra GRSV, na proporção de 1:1000, e incubada a temperatura ambiente por duas horas,  
145 sob constante agitação. Após a lavagem da membrana por três vezes com PBS-T, por 5  
146 minutos sob agitação, adicionou-se o anticorpo secundário (anti-rabbit-Invitrogen) (1:30.000),



147 sendo posteriormente incubada em temperatura ambiente por três horas sob constante  
148 agitação. Após este período, procedeu-se novamente a lavagem por 15 minutos em agitação e  
149 na mesma foi adicionado 33µL de BCIP (5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato) e 66µL de NBT  
150 (Cloreto Nitroazul de Tetrazólio). A solução ficou sob constante agitação até ser observado à  
151 formação de manchas de coloração púrpura indicando presença do vírus nos quadrantes do  
152 controle positivo e sem cor nos controles negativos, quando a reação de revelação foi  
153 interrompida através de três lavagens da membrana com água destilada.

154 O segundo teste Dot-ELISA foi realizado com antissoro contra o GRSV somente para  
155 os 18 isolados selecionados (A2, B1, C1, D1, E2, F2, G1, H1, I1, K1, L2, M1, N1, O2, P1,  
156 Q2, R1, S2), utilizando-se tecido dos hospedeiros indicadores inoculados. Extrato de planta  
157 sadia e tampão foram empregados como controle negativo, e extrato de planta *D. stramonium*  
158 infectada com o GRSV foi utilizada como controle positivo.

### 159 **Microscopia eletrônica de transmissão**

160 Com o objetivo de detectar a presença de partículas virais por meio de microscopia  
161 eletrônica, foram selecionados folíolos de amendoim com os isolados A2, E2 e K1 que  
162 exibiam sintomas característicos de virose. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento  
163 da utilização. Cortes finos foram realizados em cada amostra e transportados para eppendorf  
164 de 200µL devidamente identificados, seguindo-se as quatro etapas: fixação, contrastação,  
165 infiltração com resina e ultramicrotomia.

166 Para **fixação** foi adicionado 1mL da mistura dos fixadores, paraformaldeído e  
167 glutaraldeído, ambos fixadores primários diluídos em solução tampão de Cacodilato de Sódio  
168 na concentração 1M, visando uma melhor preservação das estruturas celulares e oferecendo  
169 um maior contraste microscópico. O tecido foliar ficou completamente imerso no fixador,  
170 sendo mantido em geladeira por 24 horas. No dia seguinte, removeu-se o fixador a fim de  
171 preservar a integridade da membrana plasmática da célula e das organelas, adicionou-se o  
172 fixador secundário Ferricianeto de potássio mais tetróxido de ósmio (1:1) suficiente para  
173 cobrir a amostra, deixou-se agir por uma hora. Em seguida lavou-se uma vez com água  
174 destilada. Para o aumento do **contraste** das estruturas celulares, adicionou-se um corante a  
175 base de metais pesados, o Acetato de Uranila 0,5% até cobrir toda a amostra. Cada eppendorf  
176 foi envolvido em papel alumínio, e levados para a geladeira ficando over night. As amostras  
177 foram lavadas 3x com água destilada. Em seguida realizou-se a desidratação com acetona:  
178 30%, 50%, 70%, 100% e 100% durante vinte minutos para cada concentração. Para realizar a

179 **infiltração**, utilizou-se acetona 100% x resina pura na proporção 3:1, ou seja, seis gotas de  
180 acetona e duas de resina, sendo homogeneizadas no vórtex. As amostras ficaram sob  
181 constante agitação em temperatura ambiente durante 24 horas. No dia seguinte, a resina e a  
182 acetona foram removidas, sendo adicionadas novamente, entretanto na proporção 2:1, depois  
183 1:1 e por fim resina pura, tendo como função atuar como meio de inclusão das estruturas  
184 fixadas. Após este processo as amostras foram emblocadas e devidamente identificadas.  
185 Seguindo-se estas etapas, foram realizados cortes semi-finos (5µm) em **ultramicrotomo**,  
186 necessários para uma triagem do material antes da visualização ao microscópio eletrônico.  
187 Verificou-se que todas as amostras infiltraram bem, visualizadas com o corante azul de  
188 tomadina, sendo posteriormente realizados cortes ultra-finos (90nm), em seguida os cortes  
189 foram coletados em grades de cobre cobertas com Fomvar para a visualização direta ao  
190 microscópio eletrônico de transmissão.

### 191 **Sequenciamento e análise de metagenômica**

192 Na primeira etapa do trabalho foi realizada a extração do RNA genômico das 35  
193 isolados, pelo método Total RNA Extraction using Hot-Phenol, modificado por Verwoerd et  
194 al., (1989), seguindo-se recomendação do fabricante. A quantidade, a integridade e tamanho  
195 dos RNAs totais foram estimados em Nano Vue e eletroforese em gel de agarose a 1%.

196 Dos RNAs extraídos, referentes aos 35 isolados virais estudados, 15 (A1, A2, B2, C1,  
197 D1, E1, E2, F1, I2, K2, L2, N1, Q2, R1 e S1) foram selecionados, de modo aleatório, para  
198 realização da Reverse Transcription - Polimerase chain reaction (RT-PCR). Para síntese do  
199 cDNA, a enzima MMLV (Invitrogen) foi utilizada com mix geral para as reações de RT-PCR  
200 com primer para TCSV e/ou GRSV e TSWV. Nos procedimentos para a reação de PCR, a  
201 temperatura de anelamento variou de acordo com o primer utilizado, sendo no caso da espécie  
202 TCSV, segmento “M”, imprescindível utilizar a temperatura de 65°C. Após a retirada da  
203 reação do Termociclador (Biocycler) seguiu-se com análise dos produtos de PCR em gel de  
204 agarose a 1%. Os fragmentos foram separados por eletroforese a 80 V/cm e observados em  
205 transiluminador – UV, que teve como parâmetro para comparação o marcador (Gene Ruler  
206 DNA Ladder Mix- Thermo Scientific).

207 Entre os isolados, o S1 foi escolhido com base nos perfis de bandas com tamanho  
208 aproximado de 520pb, amplicon esperado para o GRSV, sendo observada no gel de agarose,  
209 eluída utilizando-se o kit de purificação PureLink® Quick Gel Extraction e enviada para  
210 sequenciamento (Macrogen) usando os primers específicos (GRSV e TCSV). As seqüências

211 obtidas foram comparadas com as disponíveis GenBank e alinhadas através do MEGA 5 com  
212 o programa Clustal W.

213 Na segunda etapa com intuito de realizar análise metagenômica foi procedida uma  
214 semipurificação das amostras de tecido foliar com sintomas, organizadas e maceradas juntas  
215 em três grupos de 10g cada, em nitrogênio líquido com adição de 100mL do tampão fosfato  
216 de sódio. Os macerados foram filtrados em gaze e transferidos para tubos Falcon de 50mL,  
217 que foram centrifugados a 3800rpm por 20min a 4°C. Em seguida, volumes bem definidos do  
218 sobrenadante foram transferidos para tubos de ultracentrífuga sobre um “colchão” formado  
219 por 20 mL de uma solução de sacarose a 20%, adicionada no fundo do tubo, e procedeu-se a  
220 aferição de peso, equilibrando-se com adição ou remoção de alíquotas do sobrenadante, até o  
221 equilíbrio em todos os tubos. Logo em seguida, foi realizada uma ultracentrifugação a 33000  
222 g por 2 horas a 4°C, sendo descartado cuidadosamente o sobrenadante, ficando tubos com os  
223 pelets, deixados na bancada para secar. Após a secagem, os tubos com os pelets foram usados  
224 para extração de RNA pelo método trizol, seguindo o protocolo otimizado para este reagente.  
225 Após a extração, o RNA total foi quantificado em Nano Vue. A leitura das amostras foi  
226 realizada usando as unidades: ng/μL. Os valores da quantificação dos RNAs 1, 2 e 3,  
227 correspondentes aos três grupos de amostras, foram transformados em μg/μL, sendo o  
228 material transferido para RNA stable com capacidade para 100μg como segue: 10 μL do RNA  
229 1 (31,81 μg); 9 μL do RNA 2 (36,414 μg) e 10 μL do RNA 3 (27,89 μg), sendo fechado e  
230 levado ao Speedvac por 30 min. ficando apenas o ácido nucleico (RNA Total) que fica  
231 protegido por uma película de gel que mantém a integridade do RNA. Após retirou-se o tubo  
232 envolvendo-o em papel alumínio para proteger da luz, sendo guardado em temperatura  
233 ambiente até seguir para sequenciar por meio da técnica Next generation sequencing - (NGS).  
234 As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank e  
235 alinhadas no MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), com Clustal W para construção das árvores  
236 filogenéticas.

## 237 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

238

### 239 **Manutenção dos isolados virais e estudo de gama de hospedeiros**

240 A transmissão viral para plantas de amendoim, em casa de vegetação, foi obtida a  
241 partir de todas as amostras oriundas do campo, tanto pelo método de inoculação mecânica  
242 (Figura 2) como por enxertia (Figura 3). Contudo, para manutenção dos isolados virais

243 preferiu-se a enxertia, visando evitar o possível surgimento de RNAs Defectivos Interferentes  
 244 (Defective interfering L RNA segments), quando são realizadas sucessivas passagens dos  
 245 tospovírus para novas plantas por inoculação mecânica (RESENDE et al., 1992).



246  
 247 **Figura 2.** Exemplos de plantas de amendoim inoculadas mecanicamente, mantidas em casa de vegetação da  
 248 Universidade Federal Rural de Pernambuco. A- (E2) Manchas anelares e clorose; B- (G1) Manchas anelares,  
 249 clorose e mosaico; C- (S1) Clorose e distorção foliar.

250



251  
 252 **Figura 3.** Exemplos de plantas de amendoim mantidas na EEB exibindo sintomas de vírus após inoculação por  
 253 enxertia. A- (C1) Superbrotamento, clorose e distorção foliar; B- (S1) Distorção foliar, clorose e mosaico.

254 As plantas constantes da gama de hospedeiros apresentaram reação sintomatológica  
 255 positiva, tendo sido obtida a transmissão de vírus para: espécies da família *Chenopodiaceae*  
 256 21 dai, exibindo sintomas de lesões locais necróticas; espécies pertencentes às famílias  
 257 *Solanaceae*, *Amaranthaceae* e *Asteraceae*, mostrando sintomas entre 15 e 30 dai., sendo *N.*  
 258 *rustica* aos 15 dias, *D. stramonium* e *Physalis floridana* após 20 dias e *C. anuum* aos 30 dias.  
 259 Os sintomas apresentados pelos últimos hospedeiros foram sistêmicos na forma de pontos e  
 260 anéis necróticos ou cloróticos, cloroses, necrose das nervuras, mosaico, bolhosidade,  
 261 e oncarquilhamento, amarelecimento e “cordão de sapato” (Figura 4; Tabela 2).



262

263 **Figura 4.** Plantas testes inoculadas com diferentes isolados (entre parêntesis) exibindo sintomas característicos  
 264 de vírus. A- (A2) Mosaico e bolhosidade observadas em *Nicotiana rustica*; B- (E2) Anéis necróticos, necrose e  
 265 necrose das nervuras em *Nicotiana rustica*; C- (E2) Pontos necróticos/cloróticos e início de distorção foliar em  
 266 *Datura stramonium*; D- (D1) distorção foliar em *Capsicum annuum*; E- (D1) Encarquilhamento e clorose em  
 267 *Physalis floridana*.

268 Todos os 35 isolados virais obtidos do amendoim reproduziram nas plantas teste desta  
 269 espécie mais de um sintoma característico de tospovirose, na forma de cloroses, manchas  
 270 anelares cloróticas e necróticas, mosaico, superbrotação, encurtamento dos entrenós, nanismo,  
 271 necrose e distorção foliar. Além do mais, ao se analisar comparativamente os sintomas  
 272 descritos na literatura em plantas indicadoras infectadas com vírus do gênero *Tospovirus*,  
 273 verificou-se uma alta similaridade com sintomas observados nas plantas testadas no presente  
 274 trabalho (Tabela 2).

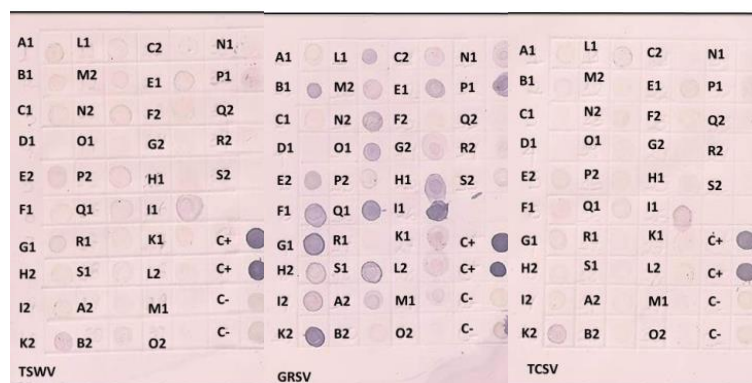


<i>Physalis floridana</i>	SS	Mo	Mo, CL, EN	Bo, DF, EN	N/x	EN, PN, CL, DF	CL	PCL	CL, EN, N	CL	CL	EN, N	DF, N, CL	PN	SS	EN, N	EN, NE, Mo	EN, N, CL
<i>Capsicum annuum</i>	SS	CL	CL, Bo	PN, CL	EN, PN, CL	CL	CL	SS	CL	PCL	PCL	CL	CL	PN	PN	CL	PCL	PCL
<i>C. annuum</i> var. IKEDA	CL	CL	EN, Mo, NE, CL, Bo	CL	CL	CL	CL	DF, CL	CL	CL	CL	SS	CL	CL	CL	PCL	CL	CL
<i>C. annuum</i> var. 679	SS	CL	EN, Mo, N, CL	EN, Mo, N, CL	CL, Bo	AM	SS	CL	SS	PCL	PCL	EN, CL, Bo, CS	CL	EN, Bo, CL, CS	CL	EN, PCL, Bo	CL	CL
<u>Amaranthaceae</u>																		
<i>Gonphrena globosa</i>	SS	SS	Mo, CL	DF, CL	SS	DF, CL	DF	SS	SS	SS	SS	CL, EN	CL	SS	SS	SS	SS	SS
<u>Asteraceae</u>																		
<i>Lactuca sativa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS

- 3 Legenda: AC - Anéis cloróticos, AN - Anéis necróticos, AM- Amarelecimento, NE- Necrose, CS- "Cordão de sapato", SB- Super brotamento, DF- Distorção foliar, PCL-  
4 Pontos cloróticos, CL- Clorose, EN- Encarquilhamento, Bo- Bolhosidade, PN- Pontos necróticos, Mo- Mosaico, SS - sem sintoma, X- Morte da planta.

## 1 Dot-ELISA

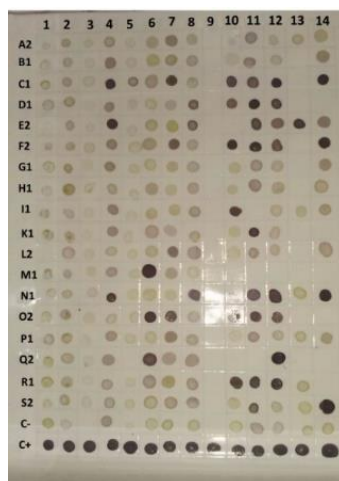
2 Os resultados da análise dos isolados de amendoim por Dot-ELISA, demonstraram  
 3 que houve reação positiva para as espécies GRSV, TSWV e TCSV, ocorrendo infecção mista  
 4 por dois ou mais vírus. No primeiro teste, a membrana contendo o antissoro para o GRSV  
 5 evidencia o resultado positivo para 16 das 35 amostras, ou seja, 46% mostraram infecção.  
 6 Para o antissoro contra o TSWV, os resultados foram positivos somente para três amostras em  
 7 torno de 8,6% de infecção e para o antissoro contra o TCSV figurou com reação positiva para  
 8 seis amostras em torno de 17% (Figura 5). Portanto, a suspeita da presença de tospovírus nas  
 9 áreas de produção em São Paulo foi confirmada pelo teste sorológico Dot-ELISA, com os  
 10 resultados positivos para as espécies GRSV, TSWV e TCSV.



18 **Figura 5.** Dot-ELISA para as espécies virais *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato spotted wilt virus*  
 19 (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) realizado com 35 amostras de plantas de amendoim com  
 20 sintomas característicos de vírus, mantidas na Estação Experimental de Biologia - (EEB) da UnB, 31 dias após a  
 21 inoculação. Plantas de *Datura stramonium* foram utilizadas como controles positivos para as espécies virais  
 22 avaliadas (C+): inoculado e controle negativo (C-): não inoculado.

23  
 24 No segundo teste Dot-ELISA com o antissoro contra o GRSV foi verificado resultado  
 25 positivo para: *D. stramonium* (10 isolados) *G. globosa*, (um) *C. annuum* var. 679, (13); *C.*  
 26 *annuum* var. Ikeda, (11); *C. annuum*, (14); *Physalis floridana*, (cinco); *N. tabacum* (15); *N.*  
 27 *rústica* (nove); *N. benthamiana* (um); *N. glutinosa* (oito) (Figura 6; Tabela 3).





28

29 **Figura 6.** Dot-ELISA realizado com amostras de 18 isolados virais inoculados em 14 espécies de hospedeiros  
 30 indicadores de vírus. As linhas representam os isolados e as colunas representam os hospedeiros indicadores: 1-  
 31 *Chenopodium quinoa*; 2- *C. amaranticolor*; 3- *Lactuca sativa*; 4- *Datura stramonium*; 5- *Gomphrena globosa*;  
 32 6- *Capsicum annuum* var. 679; 7- *C. annuum* var. Ikeda; 8- *C. annuum*; 9- sem planta; 10- *Physalis floridana*;  
 33 11- *Nicotiana tabacum* (TNN); 12- *N. rustica*; 13- *N. benthamiana*; 14- *N. glutinosa*. C- Controle negativo  
 34 (plantas não inoculadas que receberam todo o tratamento menos o inóculo); C+ Controle positivo  
 35 (*D.stramonium* infectada com GRSV).

36 **Tabela 3.** Resultado do teste Dot-ELISA com amostras dos hospedeiros indicadores inoculados com 18 isolados  
 37 virais do amendoim, realizado com o antissoro contra o GRSV

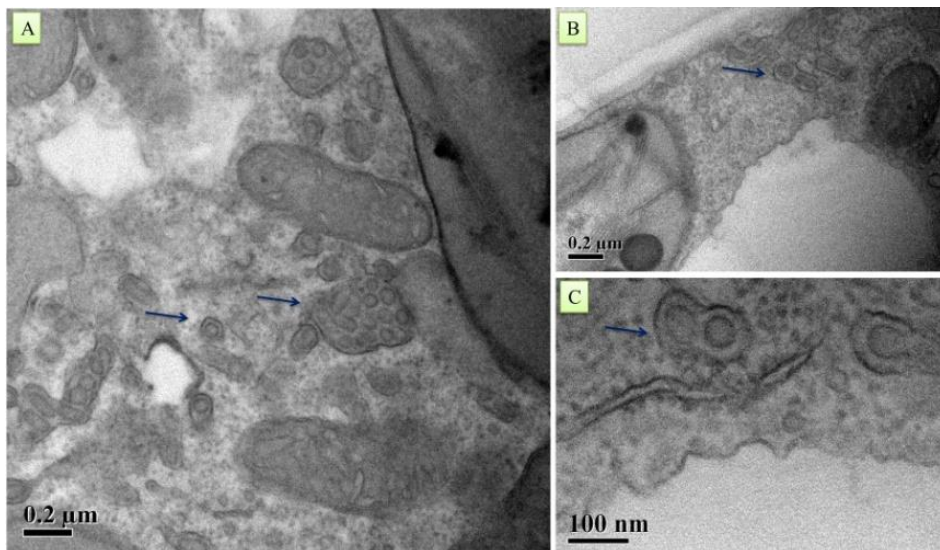
Hospedeiro indicador	Número de amostras positivas	Isolados com reação positiva
<i>Capsicum annuum</i>	14	A2, B1, D1, E2, F2, G1, H1, I1, K1, L2, N1, Q2, R1, S2
<i>C. annuum</i> var. 679	13	A2, B1, C1, E2, F2, H1, I1, K1, L2, M1, O2, Q2, R1
<i>C. annuum</i> var. Ikeda	11	A2, B1, C1, E2, F2, L2, O2, P1, Q2, R1, S2
<i>Datura stramonium</i>	10	A2, B1, C1, D1, E2, F2, G1, I1, K1; N1
<i>Gomphrena globosa</i>	1	C1
<i>Nicotiana benthamiana</i>	1	E2
<i>N. glutinosa</i>	8	B1, C1, G1, H1, I1, L2, N1, S2
<i>N. rustica</i>	9	C1, D1, E2, F2, H1, N1, O2, Q2, R1
<i>N. tabacum</i> TNN	15	A2, B1, C1, D1, E2, F2, G1, H1, K1, L2, N1, O2, P1, R1, S2
<i>Physalis floridana</i>	5	C1, F2, I1, O2, R1

38

### 39 Microscopia eletrônica

40 Nas análises eletro microscópicas de espécimes referentes aos isolados virais A2, E2 e  
 41 K1, oriundos do Estado de São Paulo, foi possível comprovar a presença de partículas com  
 42 formato esférico característico de tospovírus no interior de células do hospedeiro. Este  
 43 resultado é mais uma confirmação da ocorrência de tospovirose nas lavouras de amendoim

44 analisadas. A maioria das partículas encontravam-se organizada de forma agrupada (Figura  
45 6A-C).



46

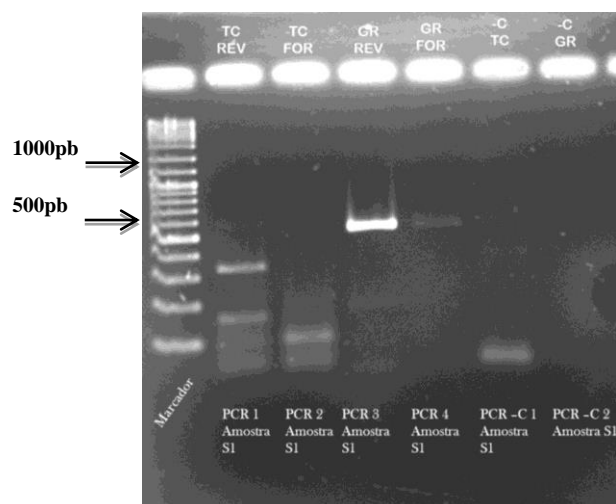
47 **Figura 7.** Micrografia eletrônica com cortes ultrafinos de amostras de plantas de amendoim (*Arachis hypogaea*  
48 L.) (0,2 µm e 100nm). A- Partículas de tospovírus organizadas de maneira agrupada; B-C partícula viral  
49 sobreposta.

50

### 51 Sequenciamento e análise de metagenômica

52 A primeira etapa do trabalho apresentou resultados satisfatórios, obtendo-se RNA e  
53 cDNA de todos os isolados, pelo uso de processos de extração e de transcrição reversa,  
54 respectivamente, bem sucedidos.

55 Na análise por RT-PCR do isolado S1, verificou-se a amplificação do primer específico  
56 para GRSV, com uma banda de aproximadamente 520pb para os segmentos “L” e “M” no  
57 sentido reverso, indicando a ocorrência de infecção em amendoim por essa espécie viral  
58 (Figura 8).



59  
 60 **Figura 8.** Resultado da análise do produto obtido da Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)  
 61 utilizando os primers de GRSV, TCSV reverse e forward em gel de agarose a 1%. Primer GRSV-reverse banda  
 62 520pb; C- Poço 1= Marcador Molecular; Poço 2= Amostra S1 testada para o TSWV; Poço 3= Controle.

63 Com o sequenciamento (Embrapa-CNPq) do fragmento do isolado S1, usando-se o  
 64 primer de GRSV para o segmento “L”, foi possível comprovar a presença dessa espécie viral  
 65 após uso do Blast, sendo as sequências alinhadas através do MEGA 6 e com o programa  
 66 Clustal W, comparando-se com as disponíveis no GenBank (Tabela 5).

67 **Tabela 5.** Comparação da sequência do isolado S1 com isolados depositados no GenBank.

Origem do Isolado	Espécie viral	Identidade	Acesso
Flórida	Groundnut ringspot and Tomato chlorotic spot virus reassortant segment L, complete sequence	98%	HQ644142
Flórida	Groundnut ringspot virus isolate 95/0188 L protein (L) gene, partial cds	95%	HQ634679
Flórida	Groundnut ringspot virus isolate 95/0137 L protein (L) gene, partial cds	95%	HQ634678
Flórida	Groundnut ringspot virus isolate + GRSV L protein (L) gene, partial cds	95%	HQ634677
Flórida	Groundnut ringspot virus isolate + TCSV L protein (L) gene, partial cds	83%	HQ634680
Brasil	Tomato chlorotic spot virus clone AB8900-2-3 RNA-dependent RNA polymerase gene, complete cds	83%	HQ700667

68  
 69 Na Florida, Webster et al. (2010) relataram a ocorrência do GRSV infectando plantas de  
 70 tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Entretanto, após uma análise detalhada, o que inicialmente foi  
 71 identificado como esse vírus, se tratava de uma recombinação do M RNA entre GRSV e o TCSV  
 72 (WEBSTER et al., 2011).

73 Na segunda etapa do trabalho, ao ser analisados os resultados obtidos do  
74 sequenciamento da metagenômica, verificou-se a presença das espécies virais PeMoV e  
75 GRSV, com genoma completo. Este é o primeiro relato, em amendoim, de sequências  
76 completas do genoma destes vírus no Brasil.

77 O primeiro relato do PeMoV foi realizado por Kuhn, (1965) nos Estados Unidos. No  
78 Brasil, Costa e Kitajima, (1974) relataram a ocorrência de um vírus transmitido por pulgão,  
79 onde mais tarde chamaram de “*peanut mosaic potyvirus*” (KITAJIMA, 1986). Anos mais  
80 tarde, o PeMoV foi detectado infectando a cultura do amendoim nos Estados da Paraíba (PIO-  
81 RIBEIRO et al., 2000) e São Paulo (ANDRADE et al., 1996). Anjos et al., (1998) também  
82 detectaram o vírus em amendoim silvestre.

83 Recentemente, no Brasil, com base em testes biológicos e sorológicos e moleculares,  
84 foi relatada a ocorrência do GRSV infectando plantações desta cultura no município de  
85 Itápolis, no Estado de São Paulo (CAMELO-GARCÍA et al., 2014).

86 Várias espécies de tospovírus têm sido relatadas infectando esta oleaginosa,  
87 resultando em perdas do rendimento da planta em diferentes partes do mundo (CHEN;  
88 CHIU, 1996; HALLIWELL; PHILLEY, 1974; REDDY et al., 1992; ANDRADE et al.,  
89 2005). Destaca-se, pela proximidade da região geográfica, o relato da ocorrência do GRSV  
90 infectando plantas de amendoim na Argentina (DE BREUIL et al., 2007).

91

## 92 CONCLUSÃO

93

- 94 • O teste de gama de hospedeiros demonstrou que todas as espécies testadas foram  
95 infectadas, por pelo menos um vírus, com maior número de isolados para *Nicotiana*  
96 *tabacum* TNN;
- 97 • Foi possível visualizar partículas de tospovírus com fixação e emblocamento de  
98 espécimes usando microscopia eletrônica de transmissão;
- 99 • Por meio do Dot-ELISA identificou-se as espécies *Groundnut ringspot virus* (GRSV),  
100 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) causando  
101 infecção nas plantas de amendoim em infecção simples e mistas;

- 102 • A espécie GRSV foi a que prevaleceu entre as amostras de amendoim avaliadas, com  
103 ocorrência do vírus na região acima de 80%.
- 104 • O tospovírus GRSV foi detectado por RT-PCR e, pela metagenômica, o genoma  
105 completo deste vírus pode ser recuperado;
- 106 • Com a metagenômica, obteve-se, também, o genoma completo do potivírus *Peanut*  
107 *mottle virus* (PeMoV).

## 108 AGRADECIMENTOS

109 Os autores agradecem ao professor Tatsuya Nagata, da Universidade de Brasília, pela  
110 colaboração na análise de Microscopia eletrônica de transmissão e ao Pesquisador Leonardo  
111 S. Boiteux, da Embrapa Hortaliças, pela obtenção das sequências analisadas.

112

## 113 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

114 ANDRADE, G. P. et al. Infecções simples e mista do *Peanut mottle potyvirus* e do *Tomato*  
115 *spotted wilt virus* em campos de amendoim no Estado de São Paulo, **Fitopatologia**  
116 **Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 421, 1996.

117 ANDRADE, G. P. et al. TCSV infectando amendoim em São Paulo: levantamento e  
118 caracterização, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 185-190, 2005.

119 ANJOS, J. R. N. et al. Infecção natural de *Arachis pintoi* por "Peanut mottle virus" no Brasil.  
120 **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 71-74, 1998.

121 BERTIOLI, D. J. et al. An overview of peanut and its wild relatives. **Plant Genetic**  
122 **Resources: Characterization and Utilization**, Netherlands, v. 9, n. 1, p. 134-149, 2011.

123 BLACK, M. C. et al. An epidemic of spotted wilt disease in south Texas peanuts in 1985.  
124 **Proceedings American Peanut Research**. Georgia, Ed. Soc. 18: 66, 1986.

125 BRITTLEBANK, C. C. Tomato diseases. **Journal Agriculture Victoria**, Georgia v. 17, p.  
126 231–235, 1919.

127 CAMELO-GARCÍA, V. M. et al. Occurrence of *Groundnut ringspot virus* on Brazilian  
128 peanut crops. **Journal of General Plant Pathology**, Dordrecht, Holanda v. 80, p. 282-286,  
129 2014.

130 CHEN, C. C.; CHIU, R. J. A tospovirus infecting peanut in Taiwan. *Acta Horticultural*. v.  
131 431, p. 57-67, 1996.

- 132 COSTA, A. S. J.; KITAJIMA, E. W. Mosaico do amendoim uma doença de vírus transmitida  
133 por sementes e por afídeo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 48, 1974.
- 134 CULBREATH, A. K. et al. Disease progress of spotted wilt in peanut cultivars Florunner and  
135 Southern Runner. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 766–771, 1992.
- 136 CULBREATH, A. K.; SRINIVASAN, R. Epidemiology of spotted wilt disease of peanut  
137 caused by *Tomato spotted wilt virus* in the southeastern U.S. **Virus Research**, Amsterdam, v.  
138 159, p. 101–109, 2011.
- 139 DE AVILA, A. C. et al. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein  
140 gene sequences. **Journal of General Virology**, London, v. 74, p. 153-9, 1993.
- 141 DE BREUIL, V. et al. *Groundnut ringspot virus*: an emerging *Tospovirus* inducing disease in  
142 peanut crops. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 251–254, 2007.
- 143
- 144 HALLIWELL, R.; PHILLEY, S. G. Spotted wilt of peanut in Texas. **Plant Disease Reporter**,  
145 Washington, v. 58, 23–25, 1974.
- 146 KING, A. M. Q. et al. Virus Taxonomy: **Ninth report of the International Committee on**  
147 **Taxonomy of Viruses**. 9 Ed. Elsevier Academic Press, 2011.
- 148 KITAJIMA, E. W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no  
149 Brasil **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, p. 1911-1985, 1986.
- 150 KUHN, C. W. Symptomatology, host range and effect on yield of a seed transmitted peanut  
151 virus. **Phytopathology**, v. 55, p. 880-884, 1965.
- 152 NAKAGAWA, J; ROSOLEM, C. A. **Amendoim: tecnologia de produção**. Botucatu,  
153 FEAPAF. p. 325, 2011.
- 154 PIO-RIBEIRO, G. et al. Occurrence of cowpea aphid-borne mosaic virus in peanut in Brazil.  
155 **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n.7, p. 760-766, 2000.
- 156 PIO-RIBEIRO, G. et al. Principais doenças do amendoim e seu controle. In: Santos, R. C.;  
157 Freire, R. M. M.; Lima, L. M. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. 2a. Ed. Brasília:  
158 Embrapa, p. 255-332, 2013.
- 159 REDDY, D. V. R. et al. Serological relationships and purification of bud necrosis virus, a  
160 tospovirus occurring in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in India. **Annals of Applied Biology**,  
161 v. 120, p. 279–286, 1992.

- 162 RESENDE, R. O. et al. Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus  
163 retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. **Journal of General**  
164 **Virology**, v. 73, p. 2509-2516, 1992.
- 165 RILEY, D. G.; JOSEPH, S. V.; SRINIVASAN, R.; DIFFIE, S. Thrips vector of topoviruses.  
166 **Journal of integrated pest management**, Illinois, v. 2, p. 1-10, 2011.
- 167 SOUMYA, K. *et al.* Molecular characterization of India isolate of Peanut mottle virus and  
168 immunodiagnosis using bacterial expressed core capsid protein. **Virus Disease**, v. 25, p. 331-  
169 337, 2014.
- 170 TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.  
171 **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, p. 2725–2729, 2013.
- 172 VERWOERD, T. C., DEKKER, B. M. M. & HOEKEMA, A. A small scale procedure for the  
173 rapid isolation of plant RNAs. **Nucleic Acids Research**, v.17, 2362, 1989.
- 174 WEBSTER, C. G. et al. First report of *Groundnut ringspot virus* infecting tomato in south Florida  
175 Online. **Plant Health Progress**, 2010.
- 176 WEBSTER, C. G. et al. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and  
177 insect infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental  
178 species. **Virology**, v. 413, p. 216-225, 2011.

## **CONCLUSÕES GERAIS**





## CONCLUSÕES GERAIS

Ao analisar os resultados apresentados na pesquisa concluiu-se que:

- Os isolados virais mantidos em amendoim, por meio de inoculação por enxertia, conservaram os tipos e intensidade dos sintomas.
- O teste de gama de hospedeiros demonstrou que todas as espécies testadas foram infectadas, com maior número de isolados em *Nicotiana tabacum*;
- Foi possível visualizar partículas de tospovírus com fixação e emblocamento de espécimes usando microscopia eletrônica de transmissão;
- Por meio do Dot-ELISA foi possível identificar as espécies *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), do gênero *Tospovirus*, causando infecções simples e mistas em plantas de amendoim;
- A espécie GRSV foi a que prevaleceu entre as amostras de amendoim avaliadas, com incidência acima de 80%;
- A ocorrência do GRSV foi comprovada com as análises realizadas por RT-PCR e metagenômica, que mostrou o genoma completo deste tospovírus;
- A presença do genoma completo do potivírus *Peanut mottle virus* (PeMoV) foi detectada em apenas uma amostra na análise da metagenômica.