



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Caracterização do groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) em áreas produtoras de melancia do Rio Grande Norte e Ceará

Tatiane Santos da Silva

**Recife - PE
Setembro - 2021**

TATIANE SANTOS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DO GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS
(GRSV) EM ÁREAS PRODUTORAS DE MELANCIA DO RIO GRANDE DO NORTE
E CEARÁ**

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.

ORIENTAÇÃO:

Orientadora: Prof. Dra. Rosana Blawid, Dr. rer. Hort.

**RECIFE - PE
SETEMBRO - 2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586c Silva, Tatiane Santos da
Caracterização do groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) em áreas produtoras de melancia do Rio Grande do Norte e Ceará / Tatiane Santos da Silva. - 2021.
109 f.

Orientadora: Rosana Blawid.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2021.

1. Citrullus lanatus. 2. GRSV. 3. Tospoviroses. I. Blawid, Rosana, orient. II. Título

CDD 632

**CARACTERIZAÇÃO DO GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS
(GRSV) EM ÁREAS PRODUTORAS DE MELANCIA DO RIO GRANDE DO
NORTE E CEARÁ**

TATIANE SANTOS DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 27 de setembro de 2021:

ORIENTADORA: PROFa. DRa. ROSANA BLAWID

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Rosana Blawid

Dr. Diêgo Rodrigues Soares Nogueira

Profº Dr. André Angelo Medeiros Gomes

**RECIFE - PE
SETEMBRO - 2021**

Aos meus pais, Antonio Batista da Silva e Rita Santos da Silva, a minha irmã Katiana Santos da Silva, aos meus amigos e colegas de trabalho, a Rosana Blawid, com todo meu respeito e amor, agradeço a todo apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela proteção, amor, superação, saúde e pela minha vida. Aos meus pais, Antonio Batista da Silva e Rita Santos da Silva, pelo esforço feito durante toda minha trajetória acadêmica.

A minha irmã Katiana Santos da Silva, por seu exemplo e referência. Ao meu companheiro de vida Edilzo de Abreu Vaz pelo apoio e compreensão.

Aos que contribuíram de forma direta e indireta na minha formação.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e aos Professores, por me proporcionarem todas as experiências fundamentais para meu aprimoramento como profissional.

A Professora Rosana Blawid que com grande maestria me orientou, auxiliou e dedicou-se para que meus colegas/amigos e eu recebêssemos o melhor ensino, tanto quanto possível. Grata por todo o conhecimento repassado. A família do laboratório de Fitovirologia em especial ao Doutorando Alejandro Risco Mendonza pelo apoio na execução dos trabalhos em laboratório, pela paciência e ao mestre José Ailton Cruz Macedo dos Santos. Agradeço a valiosa colaboração.

Aos meus grandes e inesquecíveis amigos que me acompanharam nessa empreitada, com quem dividi momentos, dentro e além da universidade, em especial: Maria Roselane Alves Oliveira, Francisco Jorge Carlos de Souza Junior.

Agradeço também a Liga Acadêmica em Fitopatologia Tropical (LIAFT) a qual honrosamente faço parte.

Ao Dr. Stephan Winter do Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Sumário

CAPÍTULO I	1
CARACTERIZAÇÃO DO GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV) EM ÁREAS PRODUTORAS DE MELANCIA DO RIO GRANDE DO NORTE E CEARÁ	1
1.0 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 A família Cucurbitaceae	1
1.2 A cultura da melancia	1
1.3 Problemas fitossanitários	2
2.0 GÊNERO <i>POTYVIRUS</i>	6
2.1 Caracterização do gênero	6
2.2 Expressão gênica	7
2.3 Transmissão	9
2.4 Sintomatologia	10
3.0 GÊNERO <i>ORTHOTOSPOVIRUS</i>	12
3.1 Caracterização do gênero	12
3.2 Expressão gênica	13
3.3 Transmissão	15
3.4 Sintomatologia	18
4.0 DETECÇÃO VIRAL E SEQUENCIAMENTO DE ALTO RENDIMENTO	20
4.1 Identificação das viroses	20
4.1.1 Ensaio de imunoabsorção enzimática em membrana de nitrocelulose (<i>nitrocellulose enzyme immunoassays</i> - Dot-ELISA)	20
4.1.2 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	20
4.2 Extração de ácido nucleico (RNA)	21
4.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i> - PCR)	22
4.3 Sequenciamento Sanger	23
4.4 Sequenciamento de alto rendimento – HTS	24
5.0 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA PARA GENOMAS VIRAIS	26
6.0 REFERÊNCIA	28
CAPÍTULO II	49
Caracterização biológica e molecular do Groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) da melancia	49
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	53

Coleta das plantas	53
Manutenção do vírus através de inoculação mecânica	55
Identificação sorológica do isolado	55
Conservação de material e sequenciamento Illumina	56
Extração de RNA total e RT-PCR	56
Montagem do genoma de GRSV	57
Análise filogenética	58
Estudo da gama de hospedeiros	63
RESULTADOS	63
Sintomas observados nos campos de melancia	63
Análise sorológica e molecular	65
Análise de bioinformática	66
Trimagem dos <i>reads</i> e adaptadores	67
Montagem de <i>contigs</i> e análise de tBLASTX	67
Montagem “ <i>De novo</i> ” de genomas virais e caracterização molecular	67
Análise filogenética	74
Recombinação	80
Estudo da gama de hospedeiros	81
DISCUSSÃO	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CONCLUSÕES GERAIS	98

RESUMO GERAL

A melancia (*Citrullus lanatus*) é cultivada em países como China, Turquia, Irã e Brasil. Viroses ocasionadas por espécies como, por exemplo, *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* são consideradas economicamente importantes para a cultura. No ano de 2015 o orthotospovírus da mancha anelar do amendoim (GRSV) foi relatado pela primeira vez na cultura da melancia, afetando campos produtivos no estado de São Paulo. Em 2020, sintomas semelhantes à virose em melancia foram encontrados em campos produtivos do estado do Rio Grande do Norte – Mossoró e Ceará, Brasil. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo realizar o diagnóstico, a caracterização biológica e molecular de GRSV e verificar a presença de outros possíveis vírus na cultura de melancia na região produtora. Para tanto, duas coletas foram realizadas: uma em janeiro de 2020 (96 amostras) e outra em janeiro de 2021 (33 amostras), representando um total de 129 amostras foliares. As amostras coletadas foram submetidas aos seguintes *Enzyme - Linked Immunosorbent* testes sorológicos: *Nitrocelulose imunoenzimática* (Dot-ELISA) e *Assay* (ELISA) usando os anticorpos anti-GRSV (0781-DSMZ, Alemanha), anti-potyvírus (0573/1-DSMZ) e anti-TSWV (0106/3-DSMZ). Em seguida, plantas de *Nicotiana Benthiana* foram inoculadas com o isolado viral coletado, onde amostras sintomáticas foram posteriormente secas a 4° C e encaminhadas ao Leibniz Institute - DSMZ para extração de RNA total e sequenciamento por alto desempenho (HTS) pela plataforma Illumina Nextera (1-2Gb, 2x301 bp). A caracterização biológica foi realizada através do estudo da gama de hospedeiros com as seguintes espécies: *N. benthamiana*, *Nicandra physalodes*, *Physalis florida*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* – Solanaceae e *Citrullus lanatus*, *Cucumis anguria*, *Cucumis sativus* - Cucurbitaceae. Cada espécie de planta foi avaliada em experimentos com dez repetições. Para a análise molecular, oligonucleotídeos específicos foram desenhados e usados na RT-PCR. Com a biblioteca de *reads* gerada através do HTS foi possível montar as sequências correspondentes aos segmentos S (3039 nt), M (4857 nt) e L (8882 nt) de GRSV_RN. Análises por Blastn utilizando as sequências nucleotídicas dos segmentos S, M e L revelaram altas identidades de 98,94%, 98,45%, 98,86%, respectivamente com sequências do isolado de GRSV do Piauí disposto no NCBI (MK503848, MK503850, MK503849). Vinte e seis amostras foliares de melancia da coleta realizada em janeiro de 2021 (segunda coleta) foram testadas via ACP-ELISA contra GRSV e potyvirus, das quais 12 foram positivas para infecção de ambos os vírus, caracterizando a ocorrência de infecção mista. O DAS-ELISA (anti-TSWV) revelou que 14 de 28 plantas de melancia foram positivas para TSWV. As amostras de melancia (*Crimson sweet*) (6), *N. benthamiana* (1) e *N. physalodes* (1) testaram positivo via RT-PCR para GRSV. Em relação aos resultados do estudo da gama de hospedeiros, as espécies *N. benthamiana*; *N. physalodes*; *C. annuum*; *S. lycopersicum*; *P. florida* e *C. lanatus* foram suscetíveis ao GRSV, confirmado por testes de Dot - ELISA. Além disso, as análises de recombinação não indicaram sinal de recombinação significativa com as sequências de GRSV. Com base nos resultados obtidos nesse estudo verificou-se que o GRSV_RN infecta os campos de melancia em Mossoró e Ceará, e que provavelmente infecção mista com outras espécies virais pode contribuir para os sintomas observados em campo.

Palavras chaves: *Citrullus lanatus*; GRSV; Tospoviroses.

GENERAL ABSTRACT

Watermelon (*Citrullus lanatus*) is mainly cultivated in China, Turkey, Iran, and Brazil. Diseases caused by viral species such as *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), and *Zucchini yellow mosaic virus* are considered economically important for the watermelon crop. In 2015, the groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) was reported for the first time in watermelon fields in Brazil, affecting productive areas in the state of São Paulo. In 2020, watermelon plants showing symptoms of virus infection were found in fields in the state of Rio Grande do Norte - Mossoró and Ceará, Brazil. Therefore, this study aimed to perform the diagnosis, biological and molecular characterization of GRSV and verify the possibility of other viral infections in watermelon plants from the region of Mossoró and Ceará. Therefore, two data collections were investigated and sampled: one in January 2020 (96 samples) and another in January 2021 (33 samples), represented by a total of 129 leaf samples. The collected samples were submitted to the following serological tests: *immunoenzymatic nitrocellulose assay* (Dot-ELISA) and *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) using anti-GRSV (0781-DSMZ, Germany), anti-potyvirus (0573/1-DSMZ), and anti-TSWV (0106/3-DSMZ) antibodies. Next, *Nicotiana Benthamiana* plants were mechanically inoculated and symptomatic leaf samples were subsequently dried at 4° C and sent to the Leibniz Institute - DSMZ for total RNA extraction and high-performance sequencing (HTS) by the Illumina Nextera platform (1-2Gb, 2x301 bp). Host range studies were performed using the following species: *N. benthamiana*, *Nicandra physalodes*, *Physalis florida*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* – Solanaceae and *Citrullus lanatus*, *Cucumis anguria*, *Cucumis sativus* – Cucurbitaceae. Each plant species was evaluated in experiments with ten replications. For the molecular analysis, specific oligonucleotides were designed and used in RT-PCR assays. With the generated *reads* the sequences corresponding to the S (3039 nt), M (4857 nt) and L (8882 nt) segments of the GRSV_RN isolate were assembled. Blastn analysis using nucleotide sequences of the S, M and L segments revealed the highest identities of 98.94%, 98.45%, 98.86%, respectively, with sequences of the GRSV isolate found in Piauí state, deposited at NCBI (MK503848, MK503850, MK503849). Twenty-six watermelon leaf samples from the second collection (January 2021) were tested via ACP-ELISA against GRSV and potyvirus, of which 12 were positive for both viruses, characterizing the occurrence of mixed infection. DAS-ELISA assays (anti-TSWV) revealed that 14 of 28 watermelon plants were positive for TSWV. Moreover, watermelon (*Crimson sweet*) (6), *N. benthamiana* (1) and *N. physalodes* (1) samples tested positive via RT-PCR for GRSV. Regarding the results of the host range study, species of *N. benthamiana*; *N. physalodes*; *C. annuum*; *S. lycopersicum*; *P. florida* and *C. lanatus* were susceptible to GRSV_RN, confirmed by Dot - ELISA tests. Furthermore, the recombination analysis did not indicate significant recombination events within GRSV sequences. Taken together, it was found that GRSV infects watermelon fields in Mossoró and Ceará, and that probably mixed infections with other viral species may contribute to the symptoms observed in the field.

Keywords: *Citrullus lanatus*; GRSV; Tospoviruses

CAPÍTULO I

Introdução Geral

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DO GROUNDNUT RINGSPOT ORTHOTOSPOVIRUS (GRSV) EM ÁREAS PRODUTORAS DE MELANCIA DO RIO GRANDE DO NORTE E CEARÁ

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A família Cucurbitaceae

A família Cucurbitaceae compreendida na ordem Cucurbitales está amplamente distribuída em todo o mundo, sendo composta por mais de 130 gêneros e mais de 900 espécies que são cultivadas em regiões tropicais e subtropicais (BISOGNIN, 2002; JEFFREY, 1980; SILVA, 2004). As espécies pertencentes a esta família apresentam porte arbustivo ou herbáceo, dividindo-se em plantas de ciclo vegetativo anual e plantas de ciclo vegetativo do tipo perene. Suas características morfológicas também incluem raízes fibrosas ou tuberosas, gavinhas solitárias dispostas de forma simples ou ramificadas, com folhas estipuladas e alternadas. As plantas podem ser classificadas como monoicas (andromonóicas ou ginandromonoicas) (DIAS; RESENDE, 2010) ou dióicas e suas flores classificadas como unissexuais e paniculadas (SILVA, 2004; XU; CHANG, 2017).

O cultivo de cucurbitáceas está presente na África, Américas, Ásia e Europa (DANE; LIU, 2007). No Brasil encontram-se relatados cerca de 30 gêneros e 200 espécies que fazem parte desta família (HORA *et al.*, 2018; SILVA, 2004). Espécies que foram domesticadas e representam uma grande expressão econômica no país, como por exemplo, *Cucumis melo* (melão), *Cucumis sativus* (pepino), *Cucurbita pepo* L. (abóbora) e *Citrullus lanatus* (melancia), são cultivadas mundialmente (ASSIS *et al.*, 2012; HORA *et al.*, 2018; SILVA, 2004; SOUSA *et al.*, 2019).

1.2 A cultura da melancia

A melancia (*Citrullus lanatus* L.) tem como centro de origem o continente Africano (ASSIS, 1999; COSTA; LEITE, 2007; FAO, 2020; ROCHA, 2010), e pode ser encontrada na forma selvagem e cultivada comercialmente. A espécie selvagem *Citrullus colocynthis* é considerada como sua ancestral (ASSIS, 1999; LI *et al.*, 2016). A melancia é uma planta anual de crescimento rasteiro, podendo seus ramos atingirem 4 a 5 m em espécies comerciais e até 10 m em espécies crioulas (ASSIS, 1999; DIAS *et al.*, 2010). Os frutos possuem tamanhos e pesos diferentes, e são encontrados com até 60 centímetros de comprimento (DIAS *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2019) e peso que varia de 1 kg (CEAGESP, 2021) a 25 kg (NAYAK; GULL,

2020). As condições predisponentes para o bom desenvolvimento e frutificação da planta englobam temperaturas que variam entre 23 e 30° C, clima de ameno a quente, baixa umidade relativa do ar e um fotoperíodo que possua dias com maior duração, temperaturas mais elevadas e noites quentes (CARVALHO, 1999; COSTA; LEITE, 2007; HODGES; LESTER, 2011; PEREIRA *et al.*, 2019).

A melancia foi introduzida no Brasil no século XVI e foi cultivada inicialmente por indígenas (CORREA, 2010; HORA *et al.*, 2018; TOMCHINSKY; MING, 2019). No mesmo período passou a ser incluída na dieta alimentar brasileira, porém não existem relatos científicos expressivos que descrevam as características da fruta da época. Os relatos existentes apenas mencionam a melancia de forma generalista, sendo a mesma comparada ao fruto do melão (MALLICK; MASSUI, 1986). Atualmente a melancia possui um grande destaque produtivo e econômico. Em 2018, a China, Turquia, Irã e o Brasil foram os maiores produtores mundiais do fruto, respectivamente (FAO, 2020). Para o mesmo ano a área total de melancia plantada no Brasil foi de 102.412 ha gerando uma produção de 2.240.796 toneladas (t). Destacaram-se como os maiores produtores de melancia do Brasil os estados do Rio Grande do Norte (391.528 t), Rio Grande do Sul (283.640 t), São Paulo (281.647 t), Goiás (241.684 t) e Tocantins (179.180 t) (IBGE, 2020).

Além do âmbito de cultivo nacional, a melancia destaca-se por ser uma cultura de fácil manejo e de grande importância para o Nordeste brasileiro, onde é plantada por pequenos e grandes produtores (COSTA; LEITE, 2007; DIAS; COSTA; FARIA, 1995). Seu custo produtivo varia de baixo (produção familiar) a alto (cultivo tecnificado). Na região Nordeste os maiores produtores são: Rio Grande do Norte, Bahia e Pernambuco (IBGE, 2020). O Nordeste é considerado o centro de diversidade das melancias no Brasil, com uma grande variabilidade genética (DIAS *et al.*, 2010; SILVA, 2004). No entanto, ressalta-se que mesmo sendo o continente Africano o centro de sua origem e disseminação, as espécies que são cultivadas e comercializadas atualmente no Brasil, em sua grande maioria, são cultivares híbridas americanas e japonesas, como por exemplo, a Crimson Sweet, Congo, Charleston Gray, Durlinda, Madera, Rubi AG-08, SP6 e Omaru Yamato. Essas cultivares apresentam maior adaptabilidade às condições de cultivos do país, apesar de possuírem uma grande suscetibilidade a pragas e doenças (FERREIRA *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2019).

1.3 Problemas fitossanitários

As espécies de melancia domesticadas e que são utilizadas no Brasil possuem propensão a doenças e pragas, sendo sujeitas aos mais diversos patógenos e pragas (afídeos, tripses, fungos, vírus, bactérias) (RODRIGUES, 2011). Estes desencadeiam variados sintomas nas plantas e

frutos causando-lhes podridões, necroses, amarelecimentos, abortamentos florais e deformação (MEDEIROS *et al.*, 2015).

A utilização de variedades que possuem algum nível de resistência a doenças geralmente é mais custosa ao produtor. Dentre as variedades cultivadas de melancia existem as que são resistentes a doenças fúngicas, como, por exemplo, as cultivares Charleston Gray com resistência a antracnose e resistência moderada ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, raça 0, a cultivar rubi resistente a antracnose e a Crimson sweet resistente a antracnose e ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, raça 0 (CARDOSO *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2001; QUEIROZ, 2015). Existem poucas variedades comerciais com resistência a viroses, entre elas podemos encontrar a cultivar híbrida Explorer F1 que possui resistência às espécies *Watermelon mosaic virus* (WMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (AGRISTAR, 2013). Mesmo com essa disponibilidade de variedades, ainda existe um alto número de problemas fitossanitários e consequentemente perdas ocasionadas pelos diversos fitopatógenos (LOPES; REIS; LIMA, 2008; TERÃO *et al.*, 2019). De acordo com Pereira (2012), às podridões gomosas em melancia podem causar perdas de até 40% na produção, caso haja uma concentração adequada do inóculo no campo para o estabelecimento da doença. Em geral, as fitoviroses provocam grandes prejuízos (MEDEIROS *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2016; SUMIDA, 2020; ULLMAN; CHO; GERMAN, 1991), e estima-se uma perda monetária anual que gira em torno de 30 bilhões de dólares em um cenário mundial (CHAUHAN *et al.*, 2019).

Os vírus são entidades biológicas que necessitam de um hospedeiro vivo para que seu ciclo replicativo aconteça, e possuem o tamanho que varia entre dezenas a centenas de nanômetros. O genoma viral é composto de ácido nucleico podendo ser de DNA (ácido desoxirribonucleico) ou RNA (ácido ribonucleico), e são cobertos por proteínas e em alguns casos (ex. vírus de plantas pertencente à ordem *Bunyavirales*) possuem uma camada lipídica mais externa denominado envelope que é recoberto de glicoproteínas (BÂNDEA, 1983; HULL; CENTRE, 2014; *International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV, 2020; MEDEIROS *et al.*, 2015). Os vírus são capazes de provocar inúmeros danos a seus cultivos hospedeiros, independente da fase de aquisição (AGUIAR, 2013; RODRIGUES, 2011). Um exemplo disto são os problemas ocasionados pelas tospoviroses. De acordo com Wangai *et al.* (2001), agricultores relataram perdas no rendimento dos frutos de até 80% nas safras de tomate do ano 2000 em províncias do Quênia provocadas pela doença vira-cabeça do tomateiro. Também foi verificado na Turquia por Sevik e Arli-sokmen (2012) que o tomato spotted wilt virus (TSWV) estudado experimentalmente causou uma redução de 42,1% no rendimento dos frutos e uma redução de 95,5% no valor comercial dos mesmos.

Em relação a doenças viróticas em melancia, as infecções podem acarretar a redução de até 100% da produtividade (SOARES *et al.*, 2016; SUMIDA, 2020). Por exemplo, a doença denominada declínio da videira, em plantas de melancia, que tem como agente causal o fitovírus squash vein yellowing virus (SqVYV) assolou os cultivos da Flórida entre os anos de 2004 e 2005 (BAKER; WEBB; ADKINS, 2008). De acordo com Kousik *et al.* (2012) as perdas produtivas provocadas à safra de 2004 no cultivo variaram de 50% a 100%, sendo estimado uma perda monetária de mais de 60 milhões de dólares. A Tabela 1 abaixo demonstra as espécies virais (e seus respectivos gêneros) que foram descritas associadas à cultura de melancia ao redor do mundo.

Tabela 1 - Vírus descritos associados a infecção na cultura da melancia.

ESPÉCIES	GÊNEROS	LITERATURA
<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	<i>Alfamovirus</i>	ALI <i>et al.</i> , 2012. NELSON; WHEELER, 1976.
<i>Bean pod mottle virus</i> (BPMV)	<i>Comovirus</i>	ALI <i>et al.</i> , 2012.
<i>Citrullus lanatus cryptic virus</i> (CiLCV)	<i>Deltapartitivirus</i>	SELA <i>et al.</i> , 2013. XIN, 2017.
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV)	<i>Tobamovirus</i>	CHOI, 2001; WU <i>et al.</i> , 2011.
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	LIMA; BARBOSA; ÁVILA, 1997; SILVEIRA, 2009.
<i>Cucumber vein yellowing virus</i> (CVYV)	<i>Ipomovirus</i>	BANANEJ <i>et al.</i> , 2006.
<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV)	<i>Polerovirus</i>	Ali <i>et al.</i> , 2012; BANANEJ <i>et al.</i> , 2006.
<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i> (CCYV)	<i>Crinivirus</i>	GU <i>et al.</i> , 2011.
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> (CYSDV)	<i>Crinivirus</i>	BROWN <i>et al.</i> , 2007; POLSTON <i>et al.</i> , 2008.
<i>Groundnut ringspot orthotospovirus</i> (GRSV)	<i>Orthotospovirus</i>	LEÃO <i>et al.</i> , 2015.
<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i> (KGMMV)	<i>Tobamovirus</i>	TAN <i>et al.</i> , 2000.
<i>Melon necrotic spot virus</i>	<i>Carmovirus</i>	AVGELIS, 1989.
<i>Melon severe mosaic orthotospovirus</i> (MeSMV)	<i>Orthotospovirus</i>	CIUFFO <i>et al.</i> , 2009.
<i>Melon yellow spot orthotospovirus</i> (MYSV)	<i>Orthotospovirus</i>	CHEN <i>et al.</i> , 2008.
<i>Moroccan watermelon mosaic virus</i> (MWMV)	<i>Potyvirus</i>	AROCHA <i>et al.</i> , 2008.
<i>Papaya ringspot virus – strain W</i> (PRSV-W)	<i>Potyvirus</i>	GONSALVES <i>et al.</i> , 2010; SILVEIRA, 2009.
<i>Soybean mosaic virus</i> (SMV)	<i>Potyvirus</i>	ALI <i>et al.</i> , 2012.
<i>Squash leaf curl virus</i> (SLCuV)	<i>Begomovirus</i>	LAZAROWITZ; LAZDINS, 1991.
<i>Squash mosaic virus</i> (SqMV)	<i>Comovirus</i>	LIMA; AMARAL, 1985.
<i>Squash vein yellowing virus</i> (SqVYV)	<i>Ipomovirus</i>	ALI <i>et al.</i> , 2012; EGEL; ADKIN, 2007.
<i>Tobacco curly shoot virus</i> (TbCSV)	<i>Begomovirus</i>	ZHAO <i>et al.</i> , 2017.
<i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)	<i>Nepovirus</i>	ABDALLA <i>et al.</i> , 2012; ALI <i>et al.</i> , 2012.
<i>Tomato spotted wilt orthotospovirus</i> (TSWV)	<i>Orthotospovirus</i>	IWAKI <i>et al.</i> , 1984.
<i>Watermelon bud necrosis orthotospovirus</i> (WBNV)	<i>Orthotospovirus</i>	LI <i>et al.</i> , 2010; SINGH; KRISHNAREDDY, 1996.
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i> (WmCSV)	<i>Begomovirus</i>	LECOQ <i>et al.</i> , 1994.

<i>Watermelon green mottle mosaic virus</i> (WGMMV)	<i>Tobamovirus</i>	PITMAN <i>et al.</i> , 2019.
<i>Watermelon leaf mottle virus</i> (WLMV)	<i>Potyvirus</i>	SA; HIEBERT; PURCIFULL, 2000.
<i>Watermelon mosaic virus</i> (WMV)	<i>Potyvirus</i>	SILVEIRA, 2009; WEBB; SCOTT, 1965.
<i>Watermelon silver mottle orthotospovirus</i> (WSMoV)	<i>Orthotospovirus</i>	RAO; LIU; LI, 2011.
<i>Zucchini green mottle mosaic virus</i> (ZGMMV)	<i>Tobamovirus</i>	ALI <i>et al.</i> , 2012.
<i>Zucchini lethal chlorosis orthotospovirus</i> (ZLCV)	<i>Orthotospovirus</i>	LIMA; DIAS, 2014
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV)	<i>Potyvirus</i>	ALI <i>et al.</i> , 2012; SILVEIRA, 2009; VEGA; REZENDE; YUKI, 1995.

Fonte: Adaptado de Quirino (2015).

Verifica-se que atualmente as doenças virais registradas em melancia no Brasil são ocasionadas por nove espécies diferentes (KITAJIMA, 2020; MAEDA *et al.*, 2021). Sendo elas relativas aos gênero/espécie e sua respectiva doença: *Potyvirus*, *Papaya ringspot virus - strain W* (PRSV-W) - vírus da mancha anelar do mamoeiro (LIMA *et al.* 2012), *Watermelon mosaic virus* (WMV) - vírus do mosaico da melancia (WEBB; SCOTT, 1965), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) - vírus do mosaico amarelo da abobrinha (LISA *et al.*, 1981), *Cucumber mosaic virus* (CMV) - vírus do mosaico do pepino, (LIMA *et al.*, 1997; YUKI *et al.*, 2000) e as espécies do gênero *Orthotospovirus*, o *Zucchini lethal chlorosis orthotospovirus* (ZLCV) - vírus da clorose letal da abobrinha (NAGATA *et al.*, 1998) e *Groundnut ringspot orthotospovirus* (GRSV) - vírus da mancha anelar do amendoim (KLESSER, 1966), *Squash mosaic virus* (SqMV) - vírus do mosaico da abóbora (LIMA; AMARAL, 1985) do gênero *Comovirus*, *watermelon crinkle leaf-associated virus 1* e *watermelon crinkle leaf-associated virus 2* do gênero *Coguvirus* (MAEDA *et al.*, 2021).

Lima e Dias (2014) observaram que de uma amostragem de 477 plantas de melancia analisadas, coletadas na região de Goiás, os seguintes vírus foram encontrados: ZLCV (47%), PRSV-W (25,7%), SqMV (6,6%), CMV (3,8%) e ZYMV (1,9%). Aguiar *et al.* (2013) observaram que o CMV inoculado em plantas de melancia (variedade Crimson sweet) apresentaram sintomas de mosaico em folhas e frutos, mudança na coloração da polpa do fruto (rosa-claro), redução de até 100% do peso frutos (comparação com testemunha), além de diminuir o teor de sólidos solúveis (°Brix) numa porcentagem que variou de 53,6 a 63,64 (respectivamente inoculadas 19 e 12 dias após a emergência da planta). Os vírus desencadeiam em suas plantas hospedeiras sintomas morfológicos, histológicos e/ou fisiológicos, tais como amarelecimento, encarquilhamento, mosaico das folhas, bolhosidade, manchas amareladas em frutos, enfezamento e reduções no tamanho das folhas e dos frutos (EVANGELISTA, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2015). Alguns sintomas podem ser característicos e correlacionados com

determinado gênero viral, como, por exemplo, a expressão de anéis cloróticos em folhas e necroses que são associados às tospoviroses e a expressão de mosaicos, associados às potyviroses. No entanto, esses sintomas também podem variar conforme a espécie viral presente, hospedeiro e com a interação com diferentes espécies virais, ou seja, em infecções mistas (ALENCAR *et al.*, 2012; FAJARDO; EIRAS; NICKEL, 2017).

2.0 GÊNERO *POTYVIRUS*

2.1 Caracterização do gênero

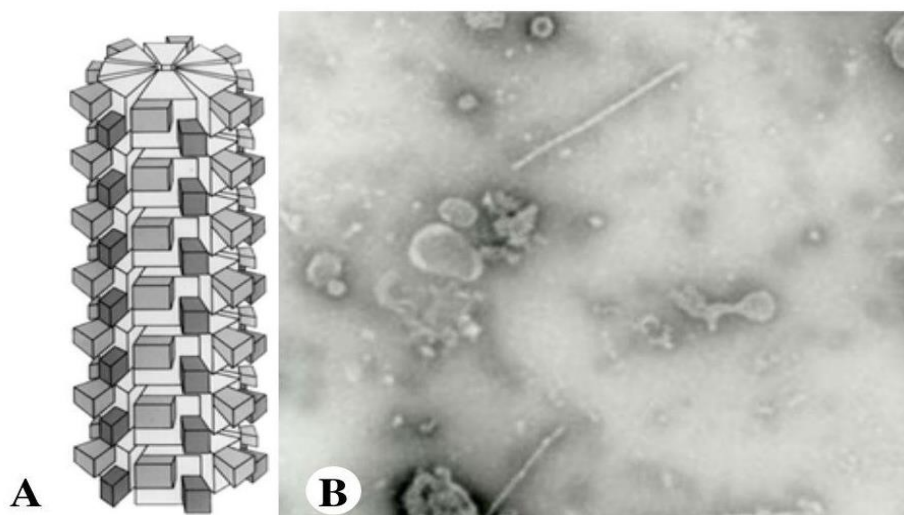
Atualmente, a família *Potyviridae* está dividida em doze gêneros: *Arepavirus*, *Bevemovirus*, *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Celavirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*, que podem ser diferenciados em relação à organização genômica, a gama de hospedeiros, a espécie de inseto vetor e a origem filogenética de cada gênero (ICTV, 2020). A maioria das espécies dos gêneros da família *Potyviridae* possui o genoma monopartido (possui o genoma constituído de um único RNA), com exceção das espécies do gênero *Bymovirus* que são bipartidos, ou seja, possui dois segmentos de RNA, uma ORF (quadro/fase de leitura aberta, *Open Reading Frame*) que codifica para oito proteínas virais e outro segmento de RNA com uma ORF que codifica para duas proteínas (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005). A família *Potyviridae* é considerada a maior e mais importante família de vírus de plantas, sendo responsável por cerca de 20% dos vírus já descritos (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; ICTV, 2020; REVERS; GARCÍA, 2015; RODRIGUES, 2011).

O maior e mais representativo gênero da família é o *Potyvirus*, que é atualmente formado por 190 espécies virais, e possui o *Potato virus Y* como a espécie tipo do gênero. Os potyvírus possuem uma ampla gama de hospedeiros (como, por exemplo, infectam espécies das famílias botânicas Solanaceae, Fabaceae, Brassicaceae) e podem ser encontrados distribuídos por todo o mundo (GADHAVE *et al.*, 2020; MOURY; DESBIEZ, 2020). Conforme o relatório do ICTV (2018), os potyvírus possuem um vírion filamentoso flexível com cerca de 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro com simetria helicoidal (Figura 1). É um vírus de fita simples de RNA de senso positivo de cerca de 9,7 kilobases (Kb).

Segundo o ICTV (2020), alguns critérios devem ser analisados para a demarcação de espécie do gênero *Potyvirus*: deve ser analisado a gama de hospedeiros e inseto vetor; e quando comparada a uma sequência de referência (sequência já estudada e disponibilizada), a poliproteína completa deve apresentar identidade menor que 82% ao nível de aminoácidos e menor que 76% ao nível de identidade nucleotídica (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005). A proteína do revestimento (*Coat Protein* - CP) deve apresentar identidade de aminoácidos

menor que 80% e menor que 76-77% ao nível de nucleotídeo e para outras regiões codificadoras a identidade nucleotídica individual varia, onde a P1 varia em torno de 58% e as demais regiões entre 74% a 78% (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; ORÍLIO, 2007). Quando as análises apontarem uma identidade menor que a estabelecida pelo gênero, considera-se como uma nova espécie viral.

Figura 1 - Ilustração esquemática da partícula de um potyvírus.



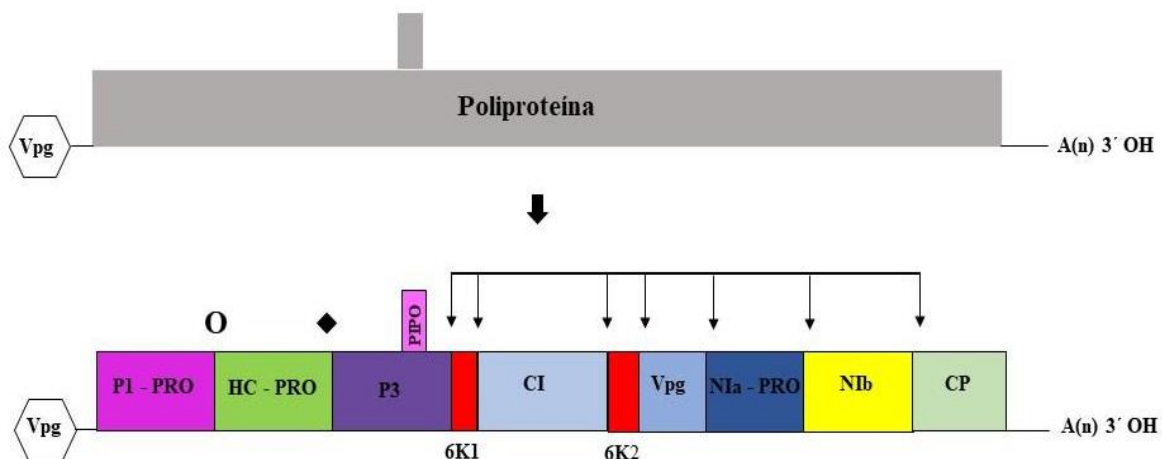
Fonte: Shukla; Ward (1989) (imagem A); Lima *et al.* (2001) (imagem B). Ácido nucleico encapsidado pela proteína CP formando uma ribonucleoproteína (A). Microscopia eletrônica da partícula viral de potyvírus (B).

2.2 Expressão gênica

O RNA viral dos potyvírus possuem em sua extremidade 5' ligado covalentemente uma proteína viral denominada *Viral Protein genome-linked* (VPg) e em sua extremidade 3', uma cauda poliadenilada (poli-A). O genoma possui uma ORF, que codifica para uma poliproteína. As proteínas P1-Pro e HC-Pro sofrem autoclivagem, as demais são clivadas pela protease NIa-pro gerando diferentes intermediários e, finalmente, dez proteínas virais são produzidas do genoma viral (VIRALZONE, 2021). A sequência da 3' UTR (*untranslated region*) é de essencial importância para o reconhecimento do RNA viral pelo complexo replicativo. A poliproteína é clivada nas proteínas: P1-Pro (Proteína P1); HC-Pro (*Helper Component-Protease*); P3 (Proteína P3); 6K1 (peptídeo de 6 kDa-1); CI (proteína de inclusão cilíndrica); 6K2 (peptídeo 6-kDa-2); VPg (proteína viral ligado ao genoma); NIa-Pro (protease de inclusão nuclear A); NIb (inclusão nuclear B, RNA polimerase dependente de RNA); CP (Proteína Capsidial, *capsid*), (ICTV, 2018; RODRIGUES, 2011; RODRIGUEZ-CEREZO; SHAW, 1991). Na região de codificação da P3 existe uma ORF adicional sobreposta denominada de PIPO (*Pretty Interesting Potyvirus ORF*) (VIJAYAPALANI *et al.*, 2012). De acordo com Olsper *et al.* (2015) a ORF PIPO é expressa como P3N-PIPO (proteína de movimento) sendo a mesma considerada parte fusionada de uma proteína produzida pela mudança de fase de

leitura. Portanto, a adição de uma adenina (A) no motivo conservado GA (6-7) promove o deslizamento da RNA polimerase na região de codificação da P3, originando o produto P3N-PIPO (OLSPERT *et al.*, 2015; RODAMILANS *et al.*, 2015). A representação esquemática da organização genômica dos potyvírus está descrita na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática da organização do genoma de um potyvírus.



Fonte: Adaptado do ICTV (2018).

O genoma de fita simples de RNA (ssRNA) é representado por uma linha e a poliproteína por uma caixa aberta com os produtos proteolíticos maduros denominados. A VPg, a proteína viral ligada ao genoma covalentemente ligada ao nucleotídeo terminal 5' é representada por um hexágono; P1-Pro (proteína 1 protease), uma proteína com atividade proteolítica serina responsável pela clivagem em sítios tipicamente por Tyr / Phe-Ser (O); HC-Pro, uma proteína com atividade componente auxiliar da transmissão do pulgão e atividade proteolítica da cisteína responsável pela clivagem tipicamente Gly-Gly (◆); P3 (proteína 3); PIPO; 6K (peptídeo de 6 KDa); A (proteína de inclusão citoplasmática); NIa-Pro (protease de inclusão nuclear A), atividade proteolítica do tipo cisteína responsável pela clivagem em Gln / Glu- (Ser / Gly / Ala) (↓); NIb (inclusão nuclear B), RNA polimerase dependente de RNA; CP (proteína capsial). Os locais de clivagem de P1-Pro, (O), HC-Pro (◆) e NIa-Pro (↓) são indicados.

A Tabela 2 descreve as principais funções das proteínas virais (P1-Pro; HC-Pro; P3; 6K1; 6K2; VPg; NIa; NIb; CI; CP) que são expressas no processo replicativo dos potyvírus.

Tabela 2 - Proteínas virais expressas e suas respectivas funções em potyvírus.

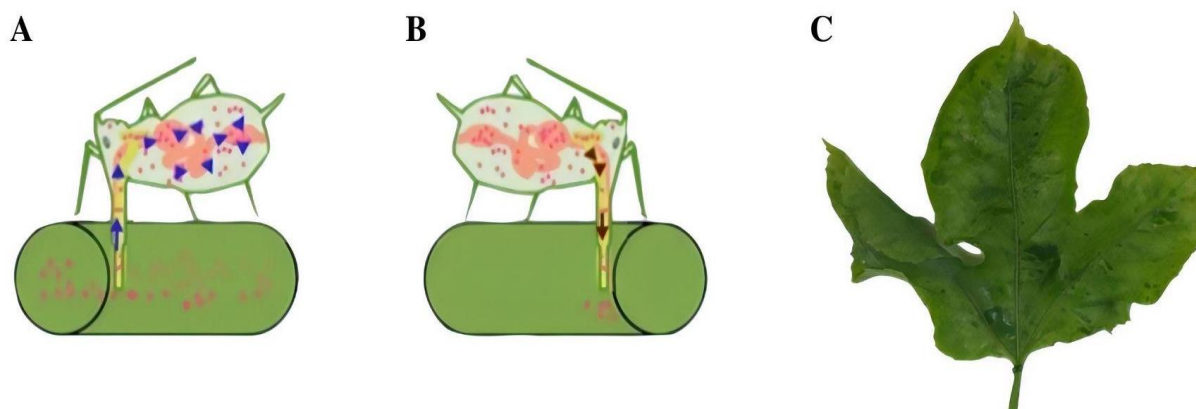
PROTEÍNAS	FUNÇÕES	LITERATURA
P1-Pro	- Exibe forte atividade de ligação ao RNA; - Fator acessório para a replicação do genoma viral; - Protease.	URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001; VERCHOT; CARRINGTON, 1995.
HC-Pro	- Determinante de sintomatologia; - Movimento célula-a-célula; - Supressora de silenciamento gênico.	MAIA; HAENNI; BERNARDI, 1996; PLISSON <i>et al.</i> , 2003.
P3	- Amplificação viral; - Ligação com o complexo viral.	URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001.
6K1	Replicação viral	CUI; WANG, 2016.
6K2	Replicação viral	GONZALEZ <i>et al.</i> , 2019.

VPg	• Especificidade com hospedeiro; • Replicação viral.	ESKELIN <i>et al.</i> , 2011; KELLER <i>et al.</i> , 1988.
NIa	• Ciclo replicativo.	VERCHOT; CARRINGTON, 1995.
NIb	• Atividade de translocação nuclear • RNA dependente de RNA polimerase	LI <i>et al.</i> , 1997; SHEN <i>et al.</i> , 2020.
CI	• Atividade ATPase; • Passagem célula a célula (complexo proteína - RNA viral).	CARRINGTON; JENSEN; SCHAAD, 1998; DENG; WU; WANG, 2015.
CP	• Especificidade do vetor (afídeo); • Montagem viral; • Movimento célula a célula e sistêmico	ANDREJEVA <i>et al.</i> , 1999; YAN <i>et al.</i> , 2021.
P3N-PIPO	• Movimento viral	REVERS; GARCÍA, 2015.

2.3 Transmissão

A transmissão dos potyvírus pode ser feita mecanicamente (SALAS; LOPES; FERERES, 2004), entretanto, o modo não-persistente de transmissão através de vetores, afídeos, como por exemplo por *Aphis gossypii* Glover, *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis craccivora* Koch é o mais comum (ICTV, 2018; BLANCARD *et al.*, 2012; SANTOS, 2010; TAVARES, 2012). A transmissão é considerada não-persistente quando o inseto vetor não se mantém virulífero por longos períodos, apenas por alguns segundos ou minutos (KALLESHWARASWAMY; KUMAR, 2008; PIRONE; PERRY, 2002). Os afídeos ao se alimentarem, com auxílio do estilete, perfuram a superfície da planta (fazendo a picada de prova, nas células epidérmicas) (KALLESHWARASWAMY; KUMAR, 2008; SANTOS, 2010). Caso a planta esteja infectada as partículas virais presentes são introduzidas pelo canal salivar do inseto e ao passar para próxima planta, fazendo novamente a picada de prova, as partículas virais presentes em seu estilete são secretadas na nova planta, como mostra a Figura 3. Uma vez que as plantas são susceptíveis e o vírus é transmitido, a doença pode ocorrer (HULL; CENTRE, 2014). Outra forma de transmissão de alguns potyvírus é por sementes, como por exemplo, as viroses causadas por ZYMV e WMV (REVERS; GARCÍA, 2015; SIMMONS *et al.*, 2013).

Figura 3 - Processo de aquisição e transmissão de potyvírus por afídeos.

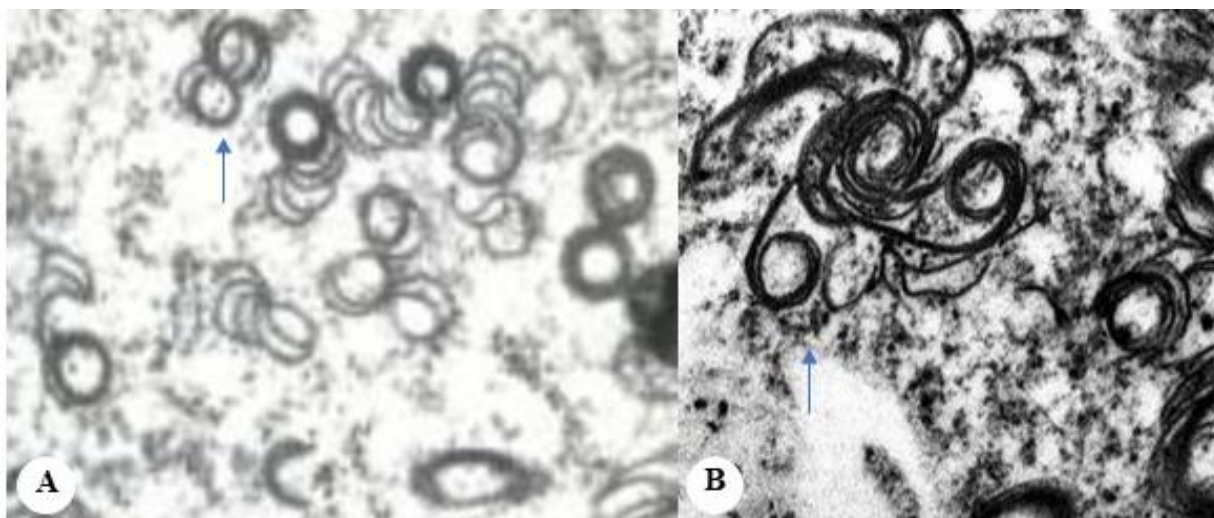


Fonte: Adaptado de GALLET *et al.* (2018). (A) Aquisição do vírus em planta doente; (B) Transmissão do vírus para planta sadia; (C) Sintoma de CABMV em planta de maracujá.

2.4 Sintomatologia

Após o contato do inseto vetor virulífero com a planta hospedeira e estabelecimento da doença, observam-se alguns sintomas tais como: mosqueado, mosaico, clorose, necrose, deformação foliar e de frutos, dentre outros sintomas (RAMOS; LIMA; GONÇALVES, 2003). Esses sintomas são comumente expressos em plantas hospedeiras das espécies de potyvírus, como, por exemplo: PRSV-W; WMV e ZYMV (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004; RAMOS; LIMA; GONÇALVES, 2003; SANTOS, 2010). Além dos sintomas visíveis expressos pela doença, também é possível observar sinais oriundos da agregação de partículas ou proteínas virais, característicos de infecções por vírus no citoplasma ou no núcleo (CHALAM *et al.*, 2020). Ao se analisar micrograficamente plantas infectadas por potyvírus é possível visualizar a presença de sinais tais como: inclusões citoplasmáticas que são semelhantes à cata-ventos (Figura 4) e inclusões nucleares cristalinas (Figura 5) (EDWARDSON, 1966; WILSON; GOODMAN; ISRAEL, 1976).

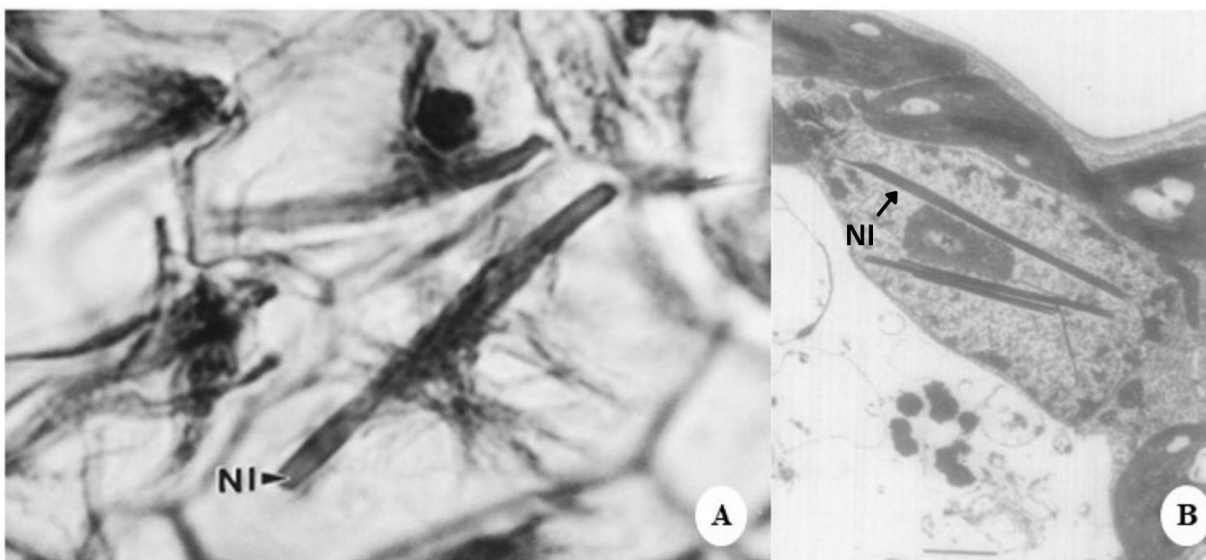
Figura 4 - Inclusões citoplasmáticas do tipo cata-vento indicadas pelas setas



Fonte: Edwardson; Christie; Ko (1984) (imagem B); Lima *et al.* (2001) (imagem A). (A) Corpos de inclusão do tipo cata-vento, PRSV; B) Corpos de inclusão do tipo cata-vento, PVY.

No processo de expressão dos potyvírus ocorre uma grande produção dos produtos gênicos, onde algumas dessas proteínas se agregarem de modo subcelular e formam estruturas estáveis (inclusões) (HAJMORAD *et al.*, 1996). Outro exemplo são as proteínas NIa e NIb que formam as inclusões nucleares cristalinas (NI) (LÓPEZ-MOYA; GARCÍA, 2008), sendo observadas no núcleo do hospedeiro (KNUHTSEN; HIEBERT; PURCIFULL, 1974).

Figura 5 - Inclusões nucleares cristalinas, induzidas por diferentes espécies de potyvírus.



Fonte: Knuhtsen; Hiebert; Purcifull (1974) (imagem B); Purcifull *et al.* (1998) (imagem A). (A) Inclusão nuclear cristalina (NI) induzida por PRSV-W em planta de melancia. (B) NI induzida por tobacco etch virus (TEV) em planta de *Datura stramonium* L.

3.0 GÊNERO *ORTHOTOSPOVIRUS*

3.1 Caracterização do gênero

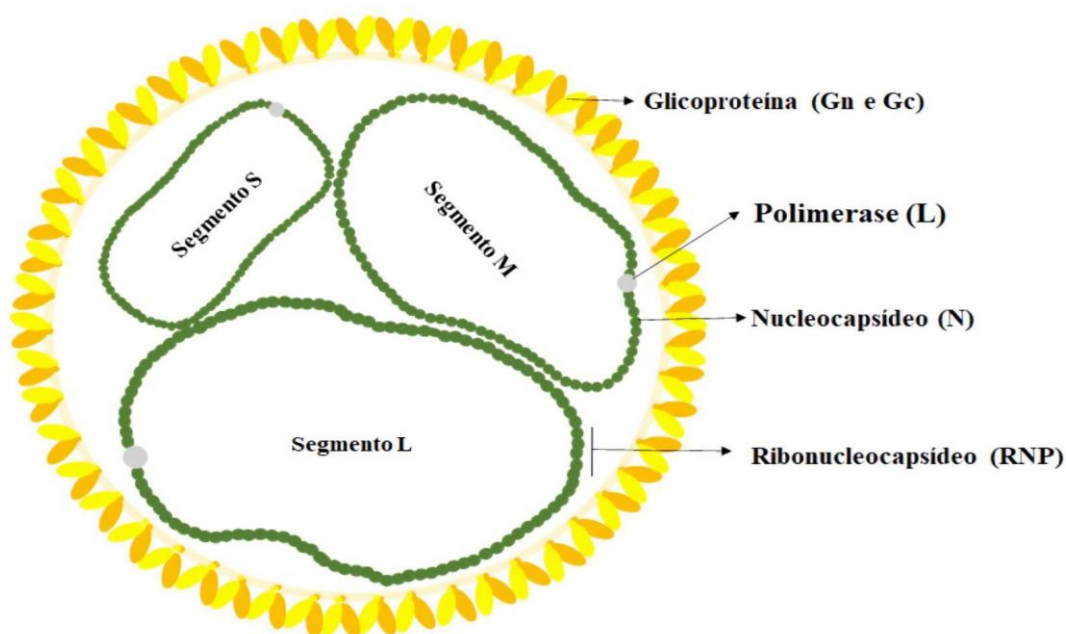
O gênero *Orthotospovirus*, taxonomicamente renomeado em 2018 pelo ICTV está inserido na família *Tospoviridae* e é composto atualmente por 26 espécies, entre estas a espécie *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV), que é a espécie tipo do gênero e nomeia a família (ASSIS FILHO *et al.*, 2005) e mais 25 espécies, sendo elas: *Alstroemeria necrotic streak orthotospovirus* (ANSV), *Alstroemeria yellow spot orthotospovirus* (AYSV), *Bean necrotic mosaic orthotospovirus* (BeNMV), *Calla lily chlorotic spot orthotospovirus* (CCSV), *Capsicum chlorosis orthotospovirus* (CACV), *Chrysanthemum stem necrosis orthotospovirus* (CSNV), *Groundnut bud necrosis orthotospovirus* (GBNV), *Groundnut chlorotic fan spot orthotospovirus* (GCFSV), *Groundnut ringspot orthotospovirus* (GRSV), *Groundnut yellow spot orthotospovirus* (GYSV), *Hippeastrum chlorotic ringspot orthotospovirus* (HCRV), *Impatiens necrotic spot orthotospovirus* (INSV), *Iris yellow spot orthotospovirus* (IYSV), *Melon severe mosaic orthotospovirus* (MSMV), *Melon yellow spot orthotospovirus* (MYSV), *Mulberry vein banding associated orthotospovirus* (MVBaV), *Pepper chlorotic spot orthotospovirus* (PEPCSV), *Polygonum ringspot orthotospovirus* (POLRSV), *Soybean vein necrosis orthotospovirus* (SVNV), *Tomato chlorotic spot orthotospovirus* (TCSV), *Tomato yellow ring orthotospovirus* (ToYRSV), *Tomato zonate spot orthotospovirus* (TZSV), *Watermelon bud necrosis orthotospovirus* (WBNV), *Watermelon silver mottle orthotospovirus* (WSMoV), *Zucchini lethal chlorosis orthotospovirus* (ZLCV) (ICTV, 2020).

O genoma viral é composto por fita simples de RNA (ssRNA) de senso negativo – onde ambas as fitas (viral e viral complementar) de ácido nucléico estão envolvidas na codificação de proteínas. Portanto, RNA's subgenômicos são gerados e servem como RNA mensageiro (mRNA) para codificação da proteína viral (NAGUYEN; HAENNI, 2003). O genoma é trisegmentado dividindo-se em: RNA S (*small*) de cerca de 2,9 Kpb, RNA M (*medium*) de ~4,8 Kpb e RNA L (*large*) com ~8,9 Kpb (ICTV, 2020). As extremidades 5' e 3' de cada segmento do genoma possui uma sequência de nucleotídeos que são conservados, 5' (AGACGAAU) e 3' (UCUGCUUA), e podem emparelhar para formar uma estrutura denominada *panhandle* (cabo de panela) (HULL, 2002; FONTES, 2017). Entre as ORFs dos segmentos S e M existe uma região denominada região intergênica, rica em U (uracila) e A (adenina), que formam estruturas secundárias conhecidas por *hairpin* (NIGAM; GARCIA-RUIZ, 2020).

A partícula viral é pleomórfica e pode variar de 80 a 120 nm de diâmetro. A partícula possui projeções de glicoproteínas com tamanho de 5 a 10 nm e que estão inseridas em um envelope de camada lipídica com espessura de cerca de 5 nm (Figura 6). O envelope é

geralmente proveniente de membranas celulares do complexo de Golgi, mas também podem ser derivadas de membranas da superfície celular (ICTV, 2020). Os ribonucleocapsídeos virais (complexo de polimerase viral mais segmentos envoltos pela nucleoproteína N) possuem um diâmetro aproximado de 2 a 2,5 nm e de 200 a 300 nm de comprimento (KIKKERT *et al.*, 1999; ICTV, 2020).

Figura 6 - Ilustração esquemática da partícula de um orthotospovírus.



As glicoproteínas Gn e Gc podem ser observadas em amarelo e laranja formando dímeros e inseridas no envelope da partícula. Em verde está representada a proteína N envolto aos RNA's virais formando os ribonucleocapsídeos (RNP), e em cinza observa-se a RNA polimerase L. Fonte: Adaptado de VIRALZONE (2020).

O segmento de RNA S é responsável pela codificação da proteína supressora de silenciamento gênico (NSs) e pela nucleoproteína (N). O segmento de RNA M codifica para a proteína GP que é precursora das glicoproteínas Gc e Gn (glicoproteínas do envelope) e a proteína de movimento (NSm), proteína não estrutural (KORMELINK *et al.*, 1993). O segmento de RNA L codifica a proteína L que possui alta massa molecular, e contém motivos conservados de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A proteína L é codificada pelo mRNA viral complementar. Os RNA S e M partilham da estratégia de expressão gênica ambisense. (Figura 7) (HULL; CENTRE, 2014; LEÃO, 2015; WEBSTER *et al.*, 2015).

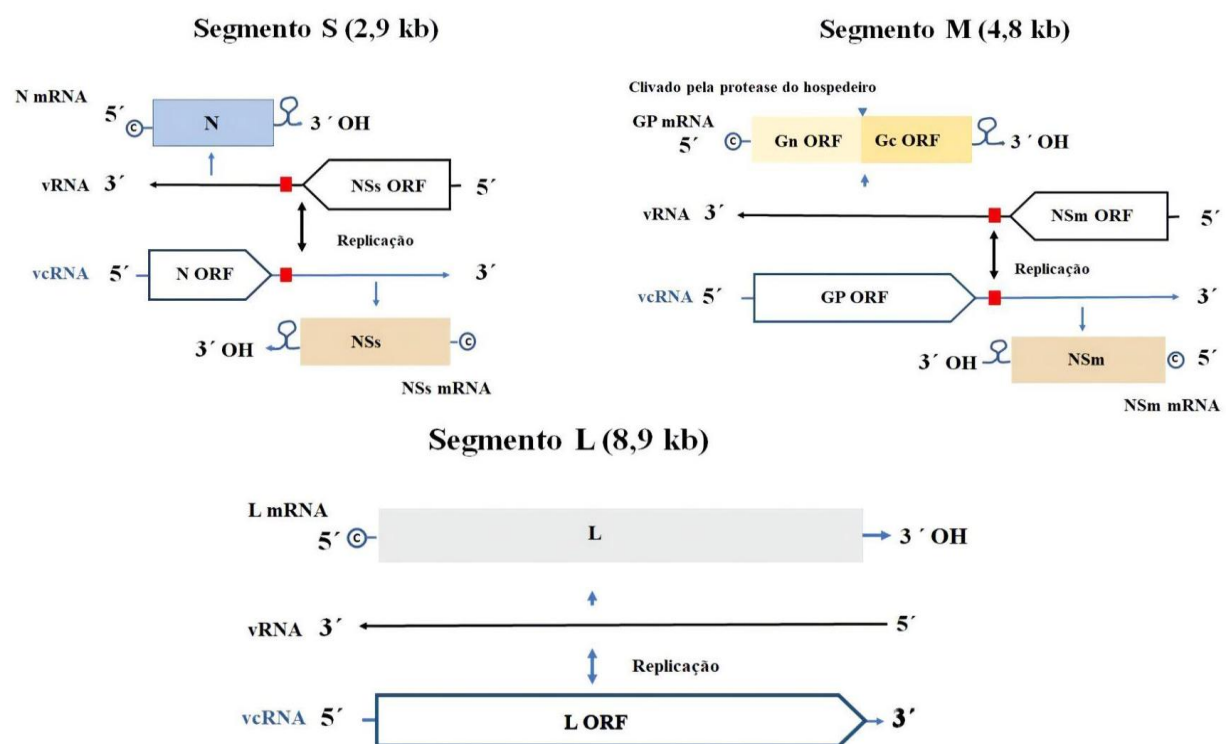
3.2 Expressão gênica

O gênero *Orthotospovirus* possui a estratégia de expressão gênica ambisense para o RNA S e M e para o RNA L a expressão gênica é feita a partir da formação de uma fita complementar (QUIRINO, 2015; VIRALZONE, 2020). O segmento de RNA L cujo genoma tem polaridade negativa não é traduzido diretamente, sendo necessária uma etapa transcricional para formação de um RNA complementar positivo, que servirá como mRNA e codifica a

proteína L (RdRp) (HAAN *et al.*, 1991). A fita complementar positiva também servirá de molde para síntese de novas fitas virais negativas. O segmento de RNA S codifica a proteína N (RNA sentido viral complementar) e NSs (RNA sentido viral); o segmento de RNA M codifica a proteína GP, que posteriormente entra em processo de clivagem co-traducional gerando as glicoproteínas Gc e Gn (RNA sentido viral complementar) e NSm (RNA sentido viral) (SCHMALJOHN; PATTERSON, 1990; LAW; SPECK; MOYER, 1992; VIRALZONE, 2020).

Os vírus de RNA negativos também compartilham da estratégia transcricional denominada *cap-snatching*. Para este processo três passos são necessários: inicialmente a RdRp viral liga-se a estrutura cap-1 ou cap-2 metilada do mRNA do hospedeiro, e a jusante da mesma, faz-se a clivagem endonucleolítica do mRNA (15 - 20 nt), gerando um RNA curto que é encapsulado e posteriormente utilizado como um *primer* que iniciará a síntese de mRNA viral pelo RdRp (DECROLY *et al.*, 2012; DUIJSINGS; KORMELINK; GOLDBACH, 2008).

Figura 7 - Estratégia de expressão do genoma de um orthotospovírus.



Os códigos na imagem representam: vRNA = RNA sentido viral; vcRNA = RNA sentido viral complementar. No segmento S: N = proteína do nucleocapsídeo; NSs = proteína supressora de silenciamento gênico. No segmento M: Gc e Gn = glicoproteínas; NSm = proteína de movimento. No segmento L: L = RNA polimerase viral. Os segmentos destacados na região 5' de cada transcrito representam a sequência *cap* (quepe) adquirida durante o processo de *cap-snatching*. Fonte: Adaptado de VIRALZONE (2020).

A replicação e a montagem do vírion pode ocorrer tanto no citoplasma das plantas hospedeiras quanto no inseto vetor (ASSIS FILHO *et al.*, 2005; GRAY; BANERJEE, 1999). O

primeiro processo na replicação será a desnudação viral. Exposto o ácido nucleico, a polimerase associada ao segmento L inicia uma transcrição que origina fitas de RNA complementares (GUU; ZHENG; TAO, 2012). Ocorre a síntese e encapsidação de RNA complementares que servirão de moldes para a síntese de RNA genômico, e replicação do genoma. Posteriormente ocorre a síntese de mRNA pela estratégia de transcrição ambisense (SUN *et al.* 2018). Os segmentos S e M possuem polaridade ambisense, e a sua transcrição gera mRNAs subgenômicos (GEERTS-DIMITRIADOU *et al.*, 2012; SCHMALJOHN; PATTERSON, 1990). Os mRNAs subgenômicos adquirem uma sequência ‘cap’ através do processo de *cap-snatching* e são traduzidos formando as proteínas (Kormelink *et al.*, 1992). Schmaljohn e Patterson (1990) sugerem que o mRNA do segmento L e S são traduzidos por ribossomos livres e os mRNAs do segmento M são traduzidos pelos ribossomos ligados à membrana celular. A glicosilação das proteínas do envelope ocorre quando recém traduzidas. A proteína GP é clivada por co-tradução originando as glicoproteínas Gc e Gn. As glicoproteínas são translocadas e acumuladas no complexo de Golgi onde são montadas (SUN *et al.*, 2018). As ribonucleoproteínas (RNPs) são cobertas por pilhas inteiras de Golgi, originando partículas de vírus com envelope duplo que se fundem entre elas e também com o retículo endoplasmático. Posteriormente ocorre a liberação dos vírions maduros (HULL, 2002; LIMA, 2015; SCHMALJOHN; PATTERSON, 1990). A Tabela 3 mostra as proteínas virais que são expressas pelos orthotospovírus.

Tabela 3 - Proteínas virais expressas e suas respectivas funções do gênero *Orthotospovirus*.

PROTEÍNA	FUNÇÃO	LITERATURA
N	Envolve os produtos do RNA;	MIR; PANGANIBAN, 2006.
NSs	Forma o nucleocapsídeo ribonucleoproteico;	TAKEDA <i>et al.</i> , 2002.
GP	Supressora de silenciamento gênico.	CIFUENTES-MUÑOZ;
	Especificidade com o vetor;	SALAZAR-QUIROZ;
	Fixação viral (ligam a partícula viral aos receptores da superfície celular);	TISCHLER, 2014.
	fusão celular vírus-membrana.	SHI <i>et al.</i> , 2010.
NSm	Movimento célula a célula;	LEASTRO, 2015.
	Determinante de avirulência.	
L	Auxilia na nuclease;	HAAN <i>et al.</i> , 1991.
	Replicase e transcriptase	

Cada proteína que é transcrita e traduzida expressa um papel importante no processo de replicação viral, onde a falta de qualquer elemento impossibilita a montagem do vírion (partícula viral completa e infecciosa) (BÂNDEA, 1983).

3.3 Transmissão

Os orthotospovírus são transmitidos de maneira circulativa propagativa por insetos pertencentes à ordem Thysanoptera que são popularmente conhecidos como tripes (FONTES,

2017; LEÃO, 2015; ROTENBERG *et al.*, 2015). Existem mais de 5000 espécies de tripses conhecidas, entretanto, apenas 14 espécies são conhecidas como vetores transmissores de orthotospovírus, existindo marcada coevolução na especificidade da transmissão entre os vírus e a espécie vetor (WHITFIELD; ULLMAN; GERMAN, 2005; PAPPU; JONES; JAIN, 2009, RILEY *et al.*, 2011). A Tabela 4 mostra as espécies de vetores associadas a tospovirose.

Tabela 4 - Espécies virais e vetores da ordem Thysanoptera associados a orthotospovírus.

ESPÉCIES VIRAIS	ESPÉCIE VETORES	REFERÊNCIAS
<i>Alstroemeria necrotic streak orthotospovirus</i>	<i>Frankliniella occidentalis</i>	HASSANI-MEHRABAN <i>et al.</i> , 2010.
<i>Alstroemeria yellow spot orthotospovirus</i>	<i>Thrips tabaci</i>	HASSANI-MEHRABAN <i>et al.</i> 2019.
<i>Bean necrotic mosaic orthotospovirus</i>	Desconhecido	---
<i>Calla lily chlorotic spot orthotospovirus</i>	<i>Thrips palmi</i>	CHEN <i>et al.</i> , 2012; CHEN, <i>et al.</i> , 2005; RILEY <i>et al.</i> , 2011.
<i>Capsicum chlorosis orthotospovirus</i>	<i>Ceratothripoides claratris</i> , <i>T. palmi</i>	PREMACHANDRA <i>et al.</i> , 2005.
<i>Chrysanthemum stem necrosis orthotospovirus</i>	<i>F. occidentalis</i> , <i>Frankliniella schultzei</i>	NAGATA; ÁVILA, 2000.
<i>Groundnut bud necrosis orthotospovirus</i>	<i>T. palmi</i> , <i>F. schultzei</i> ,	WIJKAMP <i>et al.</i> , 1996.
<i>Groundnut chlorotic fan spot orthotospovirus</i>	<i>Scirtothrips dorsalis</i>	OLIVEIRA, 2011
<i>Groundnut ringspot orthotospovirus</i>	<i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>Frankliniella intonosa</i>	CHEN <i>et al.</i> , 2019; OLIVEIRA, 2011; NAGATA <i>et al.</i> , 2004.
<i>Groundnut yellow spot orthotospovirus</i>	<i>Scirtothrips dorsalis</i>	OLIVEIRA, 2011.
<i>Hippeastrum chlorotic ringspot orthotospovirus</i>	<i>Taeniothrips euchariei</i>	XU <i>et al.</i> , 2017.
<i>Impatiens necrotic spot orthotospovirus</i>	<i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. intonosa</i>	ALMASI, M. A.; ALMASI, G., 2018; ZHAO; ROSA, 2020.
<i>Iris yellow spot orthotospovirus</i>	<i>T. tabaci</i> , <i>F. occidentalis</i>	DIAZ-MONTANO <i>et al.</i> , 2011; DOEDERLEIN; SITES, 1993.
<i>Melon severe mosaic orthotospovirus</i>	Desconhecido	---
<i>Melon yellow spot orthotospovirus</i>	<i>T. palmi</i>	ADACHI-FUKUNAGA; TOMITAKA; SAKURAI, 2020.
<i>Mulberry vein banding associated orthotospovirus</i>	Desconhecido	---
<i>Pepper chlorotic spot orthotospovirus</i>	Desconhecido	---
<i>Polygonum ringspot orthotospovirus</i>	<i>Dictyothrips betae</i>	CIUFFO <i>et al.</i> , 2010; RILEY <i>et al.</i> , 2011.
<i>Soybean vein necrosis orthotospovirus</i>	<i>Frankliniella fusca</i> <i>Frankliniella tritici</i>	HAN <i>et al.</i> , 2019.
<i>Tomato chlorotic spot orthotospovirus</i>	<i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. intonosa</i>	NAGATA <i>et al.</i> , 2004.
<i>Tomato spotted wilt orthotospovirus</i>	<i>Frankliniella cephalica</i> , <i>F. occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F. intonosa</i> , <i>Frankliniella bispinosa</i> , <i>F. fusca</i> , <i>T. tabaci</i>	NAGATA <i>et al.</i> , 2004; OHNISHI <i>et al.</i> , 2006; RILEY <i>et al.</i> , 2011; WIJKAMP <i>et al.</i> , 1996.

<i>Tomato yellow ring orthospovirus</i>	<i>F. occidentalis, T. tabaci</i>	MORTAZAVI; ALEOSFOOR; MINAEI, 2013.
<i>Tomato zonate spot orthospovirus</i>	<i>F. occidentalis</i>	ZHENG, X. <i>et al.</i> , 2019.
<i>Watermelon bud necrosis orthospovirus</i>	<i>T. palmi</i>	OLKAR <i>et al.</i> , 2018.
<i>Watermelon silver mottle orthospovirus</i>	<i>T. palmi</i>	MOU <i>et al.</i> , 2021.
<i>Zucchini lethal chlorosis orthospovirus</i>	<i>Frankliniella zucchini</i>	NAKAHARA; MONTEIRO, 1999.

Dentre as 14 espécies transmissoras de orthospovírus (ROTENBERGE *et al.*, 2015), especialmente três são relacionados a transmissão de vírus a cultura da melancia: *Thrips tabaci*, *T. palmi* e *Frankliniella schultzei* (COSTA *et al.*, 2014; QUEIROZ, 2015). O tripses, para cultura da melancia, é considerado uma praga potencial, ou seja, de ocorrência esporádica, regional e de baixa densidade populacional e tem o potencial de causar prejuízos econômicos, especialmente por ser vetor de vírus, e causar danos em partes florais e tecido da planta (LEÃO, 2015; NAGATA *et al.*, 2002; WHITFIELD; ULLMAN; GERMAN, 2005). No Brasil, *F. schultzei* foi encontrado na cultura de melancia cultivada no Rio Grande do Norte e em São Paulo (LEÃO, 2015; QUEIROZ, 2015). A Figura 8 mostra uma visão inferior e outra superior de *Frankliniella* sp. coletada em campos de melancia em Mossoró.

Figura 8 - *Frankliniella* sp. (Thysanoptera) associado a plantas de melancias em áreas produtivas do Rio Grande do Norte.



vista inferior



vista superior

Fonte: Registrada pela autora.

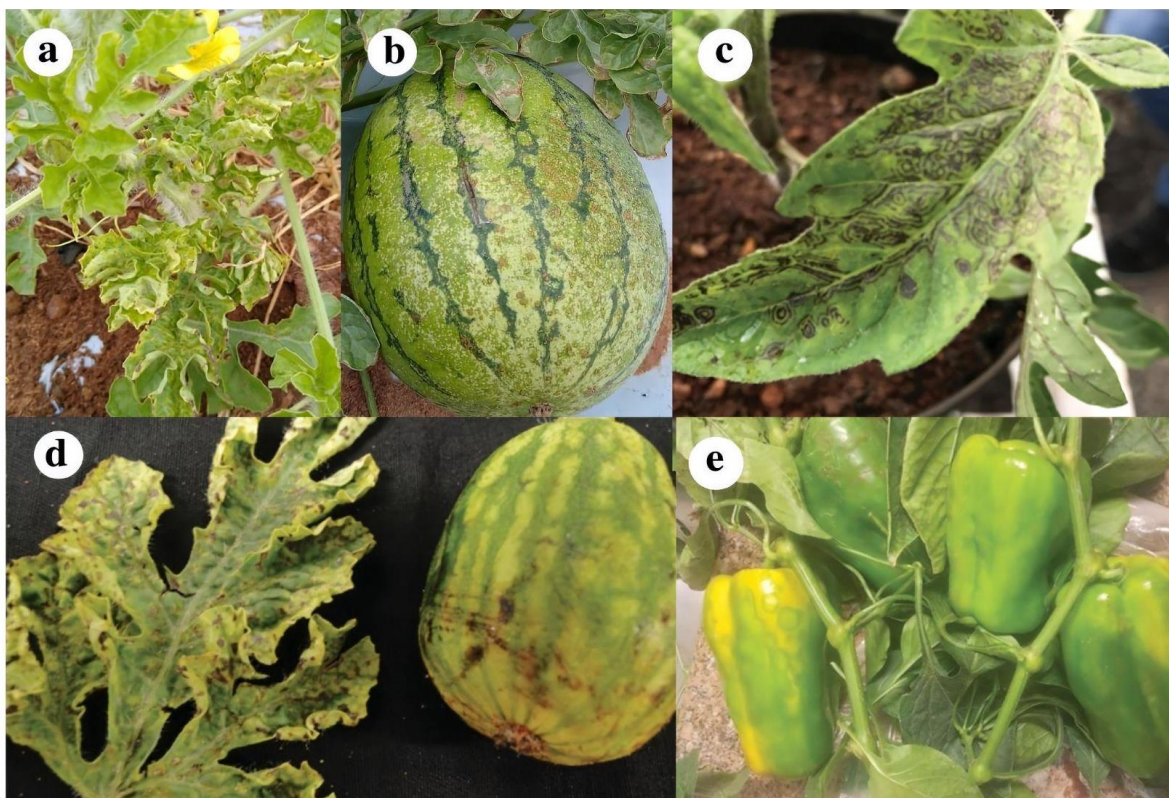
A imagem acima representa a vista inferior e superior de Thysanoptera encontrado em plantas de melancias com sintomas virais.

O ciclo de vida dos tripses está dividido em seis fases das quais seguem: ovo, primeiro instar, segundo instar, pré-pupa, pupa e inseto adulto (RODRIGUES, 2011). De acordo com Rotenberg *et al.* (2015), insetos adultos não se tornam virulíferos. A aquisição dos vírus ocorre apenas em estádios larvais e a transmissão do mesmo se inicia após o estágio de segundo instar (RODRIGUES, 2011; ROTENBERG *et al.*, 2015). Essa aquisição é permitida pela presença das glicoproteínas (Gn e Gc) presentes no envelope viral que conferem a especificidade do vírus-vetor (MORITZ; KUMM; MOUND, 2004). Os tripses possuem três segmentos de intestino: intestino anterior; médio que é dividido em três porções (mg1; mg2; mg3) e posterior. Uma vez adquirida o vírion pelo inseto vetor no estágio de instar, o vírus começa a replicar na porção mg1 do intestino médio. Na fase de primeiro instar ocorre a replicação no epitélio na porção mg1 e posteriormente a replicação ocorre em fibras musculares. No segundo estágio larval, a replicação ocorre em células epiteliais nas porções mg1 e mg3 do intestino médio e também passa a ser replicada nas células musculares do intestino anterior (ASSIS FILHO *et al.*, 2002).

3.4 Sintomatologia

Uma vez que o principal modo de transmissão dos orthotospovírus é através do inseto vetor tripses, a gama de hospedeiros deste gênero torna-se intrinsecamente relacionada com as culturas de alimentação, como por exemplo, alface, tomate, pimentão, cebola, melancia, dentre outras (AGRIOS, 2005; OLIVER; WHITFIELD, 2016; RILEY *et al.*, 2011). Um exemplo de membro do gênero com uma ampla gama de hospedeiros é o TSWV. Um levantamento desenvolvido por Parrella *et al.* (2003) mostrou que há pelo menos 1090 espécies de plantas suscetíveis ao vírus. Os sintomas podem variar de acordo com o órgão atingido, idade e tipo de hospedeiro. No entanto, os sintomas mais característicos de fitovirose são: a redução do crescimento da planta ou fruto com a ocorrência de manchas que inicialmente podem ser cloróticas que se estendem a necroses nas folhas, manchas que apresentam formato de anéis concêntricos e também o bronzeamento em caules, hastes e folhas (Figura 9) (AGRIOS, 2005; FONTES, 2017; ZHENG *et al.*, 2020).

Figura 9 - Sintomas de orthotospovírus.



Fonte: Pavan *et al.* (2018) (c, d, e); próprio autor (2021) (a, b).

Na figura 9 podemos ver os sintomas de GRSV em folhas (a) e frutos (b) de melancia. Sintomas de TSWV em folhas de tomate (c); ZYMV em folha e fruto melancia (d); orthotospovírus em fruto de pimentão (e).

Os primeiros sintomas de infecção por orthotospovírus na planta se iniciam geralmente de 7 a 10 dias após o contato com inseto vetor virulífero ou agente transmissor, e tornam-se sistêmicos entre os 15 e 20 dias após infecção (SUDEEP *et al.*, 2012). De uma maneira geral, não se faz o diagnóstico de uma doença viral apenas pelos sintomas morfológicos observados, sendo necessário a utilização de testes sorológicos e/ou moleculares para realizar a diagnose e caracterização viral. Os critérios de delimitação de espécie devem ser observados quando se trabalha com possíveis espécies novas (DALLAGNOL, 2018). Para a delimitação de espécie viral dos orthotospovírus os critérios são: a morfologia das partículas, organização do genoma, especificidade do vetor, variedade de hospedeiros, a relação sorológica de anticorpos policlonais produzidos contra a proteína N e a identidade nucleotídica da sequência de aminoácidos (aa) da proteína N, que deve ser menor que 90% quando comparada com outras sequências virais (ZHENG *et al.*, 2020, ICTV, 2020).

4.0 DETECÇÃO VIRAL E SEQUENCIAMENTO DE ALTO RENDIMENTO

4.1 Identificação das viroses

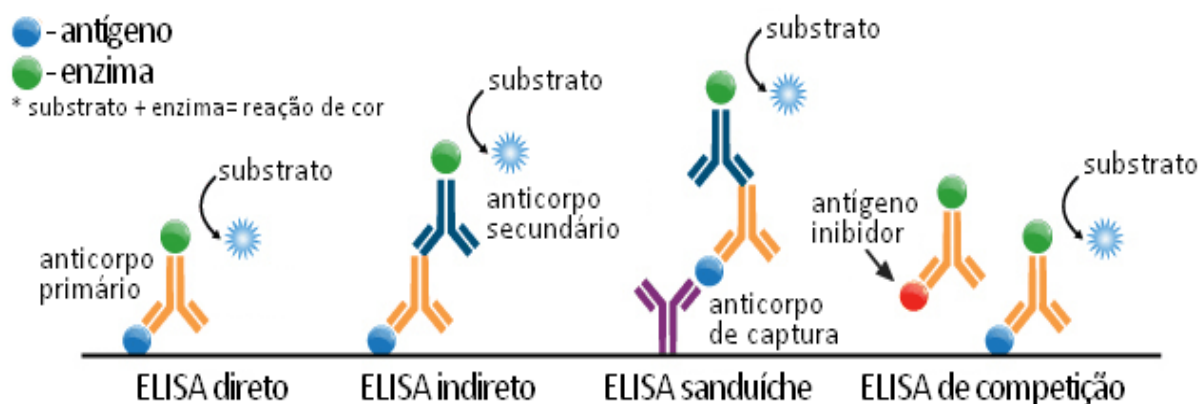
4.1.1 Ensaio de imunoabsorção enzimática em membrana de nitrocelulose (*nitrocellulose enzyme immunoassays* - Dot-ELISA)

O Dot-blot *nitrocellulose enzyme immunoassays* (Dot-ELISA) é uma técnica de imunoensaio amplamente conhecida que oferece rapidez para triagem de amostras. Esta técnica permite a detecção de proteínas virais (NADALA; LOH, 2000). A técnica utiliza uma membrana de nitrocelulose que interage com proteínas alvo (se ligam físico-quimicamente) possivelmente pela natureza hidrofóbica da mesma (OSS-VAN; GOOD; CHAUDHURY, 1987). Nesta técnica, amostras são maceradas e adicionadas à membrana, permitindo a secagem, que é posteriormente bloqueada, lavada com tampão de lavagem e coberta por anticorpos específicos para detecção de antígenos. O resultado da interação pode ser obtido através de colorimetria para detecção de antígenos (STOTT, 1989).

4.1.2 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

A técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) é uma técnica que possui alta sensibilidade, possibilitando detectar a presença viral em baixas concentrações, de 1 a 10 ng/ml, e permite o teste de várias amostras simultaneamente (CLARK; LISTER; BAR-JOSEPH, 1986; VOLEER *et al.*, 1976). Nestes testes são utilizados antígenos-anticorpos que interagem entre si especificamente. O teste de ELISA possui diversas variações sendo elas: ELISA simples/direto; ELISA indireto; ELISA competitivo e ELISA sanduíche (Figura 10), sendo a última mais específica, por utilizar dois anticorpos (REEN, 1994).

Figura 10 - Representação esquemática das variações de ELISA existentes.



Fonte: PENSABIO (2021). As esferas em azul escuro representam o antígeno (produto reconhecido por um anticorpo, ex. vírus). As esferas em azul claro representam o substrato. As esferas em vermelho representam o antígeno inibidor. As esferas em verde representam as enzimas que marcam o anticorpo e junto com o substrato conferem a reação de coloração. A forma de Y invertido na coloração laranja representa o anticorpo (proteína específica capaz de reagir com o antígeno) primário. A forma de Y invertido na coloração azul representa o anticorpo secundário. A forma de Y na coloração roxa representa o anticorpo de captura.

O teste é realizado em placas de 96 poços. No teste de ELISA do tipo direto, o antígeno é imobilizado diretamente no fundo da placa e é detectado através de um anticorpo primário específico já conjugado com um emissor de fluorescência. A ELISA indireta é semelhante ao direto, entretanto, utilizam-se dois anticorpos no processo, sendo o segundo marcado para a detecção (VITRAL, 2021). No ELISA do tipo sanduíche o anticorpo de captura (primário) é adsorvido na placa, e posteriormente adiciona-se a amostra a ser analisada permitindo que o antígeno se ligue ao anticorpo, então, adiciona-se o anticorpo secundário marcado ou um anticorpo secundário e terciário marcado. No ELISA de competição um antígeno marcado competirá com um antígeno alvo e quanto mais fraca for a reação de coloração, maior a quantidade de antígeno alvo (PENSABIO, 2021).

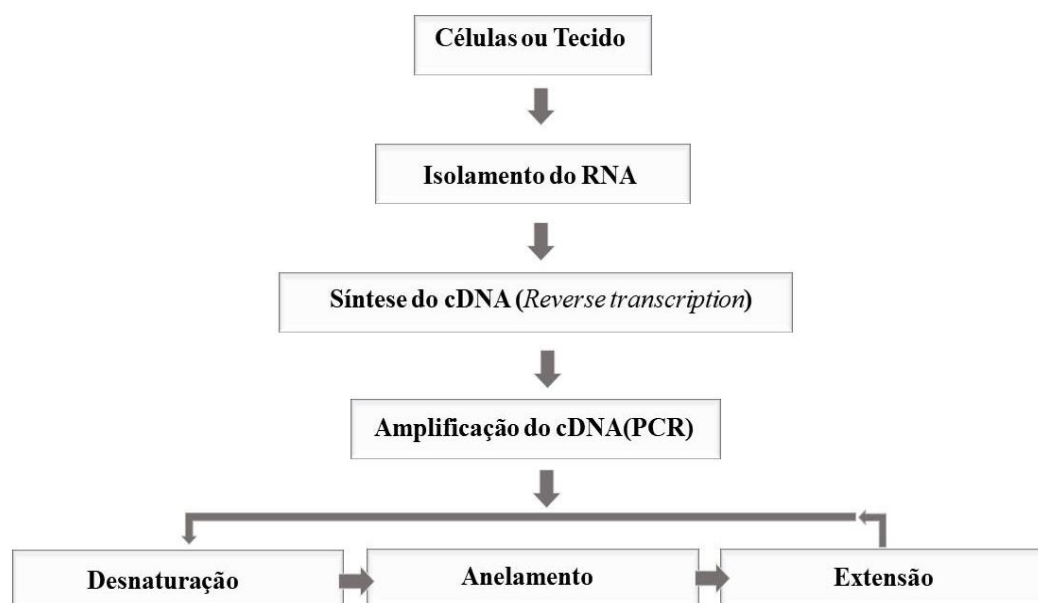
4.2 Extração de ácido nucleico (RNA)

Para a extração total de ácidos nucleicos pode-se utilizar tecidos frescos e/ou, no caso insetos, tecidos conservados em álcool 70% ou outros conservantes (OLIVEIRA *et al.*, 2002, PARK; SASIK; REYA, 2017). O melhor método deve ser escolhido conforme o material a ser utilizado, tendo em vista que há materiais com excesso de polissacarídeos ou compostos fenólicos, fatores que podem levar ao comprometimento da extração, principalmente em extrações de RNA, visto que o mesmo é facilmente degradado (GOUVEIA *et al.*, 2011, PARK; SASIK; REYA, 2017). Geralmente, a extração do ácido nucleico é dividida em duas etapas: a primeira etapa é definida pela lise celular, ou seja, ocorre o rompimento de membranas, parede celular e organelas. Essa lise pode ser realizada de forma mecânica (exemplo: Congelamento/descongelamento; maceração) ou por métodos químicos (exemplo: Dodecil sulfato de sódio – SDS; Triton X-100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$)) (EMAUS *et al.*, 2020). A segunda etapa contém passos de extração e detecção. Nesta etapa é utilizado um solvente imiscível (fenol-clorofórmio) que concentra os analitos e separa a amostra em duas fases, uma inferior hidrofóbica e outra superior hidrofílica. A parte superior (sobrenadante) contém o ácido nucléico, que é recolhido e precipitado, e, posteriormente lavado e solubilizado por exemplo em água estéril (TAN; YIAP, 2009). Para tanto, existem diversos protocolos disponíveis e com metodologias diferentes para extração de RNA de alta qualidade como, por exemplo: extração pelo método CTAB (*cetyl trimethylammonium bromide*) (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993); TRIZOL (SIMMS; CIZDZIEL; CHOMCZYNSKI, 1993) e extração através de kits como, por exemplo, o kit RNeasy Plant Mini Kit da Qiagen (EUA), kits da Zymo Research (CA, EUA), entre outros.

4.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR)

Diversas técnicas são constantemente utilizadas em análises moleculares, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) uma delas. A PCR é uma técnica desenvolvida para amplificação *in vitro* de DNA ou RNA por *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), caracterizada pela amplificação exponencial de fragmentos de DNA, onde o produto gerado pode ser utilizado para análises de detecção/sequenciamento de espécies (SANTOS, 2004). Um passo é adicionado a técnica quando a amplificação é a partir de modelos de RNA, pois é necessário que haja a síntese de cDNA (DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro) (BACHMAN, 2013). Para a síntese de cDNA utiliza-se a enzima transcriptase reversa que é uma DNA polimerase dependente de RNA (FARKAS; HOLLAND, 2009). Também são utilizados desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), DL-ditiotreitol (DTT), solução tampão, inibidores de RNase e água contendo dietilpirocarbonato (DEPC) (GOUVEIA *et al.*, 2011). O cDNA é utilizado como molde na RT-PCR (MARMIROLI; MAESTRI, 2007). O esquema na Figura 11 representa as etapas da RT - PCR.

Figura 11 - Representação esquemática de uma RT-PCR realizado a partir da fita modelo de RNA.



Fonte: adaptado de SANTOS, 2004.

A PCR é preparada em um microtubo, onde é feita uma mistura de água, tampões, *primers*, enzimas e ácido nucléico extraído da amostra a ser testada (DNA ou cDNA). Essa mistura é colocada em um termociclador que inicia a reação dividindo-a em três etapas: (i) desnaturação (abertura da fita dupla de DNA ou desnaturação da fita simples de cDNA), (ii) anelamento (associação dos *primers* com a fita de DNA ou cDNA e determinam a região de

amplificação de interesse) e (iii) extensão (ocorre a síntese de novas fitas de DNA). O processo é repetido e ocorre o aumento exponencial da quantidade de fragmentos gerados (SCHOCHETMAN; OU; JONES, 1988).

4.3 Sequenciamento Sanger

A técnica de sequenciamento Sanger ou método de terminação de cadeia foi desenvolvida em 1977 por Frederik Sanger e seus colaboradores, baseando-se na determinação de sequência de nucleotídeos de um fragmento de DNA, que pode ter o comprimento de 100 a 1000 pares de bases. Esta técnica é considerada de primeira geração, ou seja, faz parte da tecnologia inicial desenvolvida para sequenciamento de DNA (GRADA; WEINBRECHT, 2013; ZIMMERMANN *et al.*, 1988). Atualmente o sequenciamento Sanger ainda é utilizado em análises genômicas por pesquisadores para validar resultados de sequenciamento em massa *High-Throughput Sequencing* - HTS (BECK; MULLIKIN; BIESECKER, 2016).

O processo da reação se inicia com a desnaturação da fita dupla de DNA. Uma vez desnaturado o DNA, este torna-se em fita simples. A esta reação são adicionados oligonucleotídeos; alongadores de cadeia (dNTPs, trifosfatos de desoxinucleotídeos) que se ancoram de forma complementar à fita molde (estendem a fita), usando os nucleotídeos: adenina (A), citosina (C), guanina (G), timosina (T) e trifosfatos didesoxinucleotídicos de terminação de cadeia – ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Este alongamento continua até que um ddNTP seja adicionado a fita gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Os ddNTPs possuem um marcador fluorescente e cada nucleotídeo ligado ao ddNTP possui uma fluorescência diferente (por exemplo: A – verde, C – azul, G – amarela, T – vermelho), sendo os fragmentos marcados separados por meio de eletroforese (GOMES; KORF, 2018). A leitura dessas sequências é feita com uma máquina automatizada, capaz de identificar a base inserida pela análise computacional (FIETTO; MACIEL, 2015) como pode ser observado na Figura 12.

[illegible]

4.4 Sequenciamento de alto rendimento – HTS

A tecnologia de sequenciamento do tipo 454 FLX é dividida em três etapas, sendo: (i) o preparo da amostra; (ii) a PCR em emulsão; e última etapa (iii) o sequenciamento. Inicialmente o DNA é fragmentado e a esses fragmentos são incorporados à adaptadores, cada se ligando a uma extremidade do fragmento. Após ligados, os fragmentos são desnaturados (TRACHTENBERG; HOLCOMB, 2013). Os adaptadores permitirão que os fragmentos sejam separados para formação da biblioteca e posteriormente as microesferas magnéticas (*beads*), (que possuem sequências que pareiam com o adaptador) capturam o fragmento de DNA carregado pelo mesmo e são colocados em uma solução emulsão (água e óleo). A partir da emulsão é realizada a PCR em emulsão e cada microesfera dará origem a milhares de cópias de moléculas idênticas (FIETTO; MACIEL, 2015). Na etapa de sequenciamento, cada *bead* será

capturado individualmente em poços do suporte de sequenciamento e a estes serão adicionados reagentes (como por exemplo a DNA polimerase, luciferases, sulfúrilase, entre outros). O processo é chamado de pirosequenciamento. A cada poço é incorporado um nucleotídeo diferente, onde ocorre a liberação do pirofosfato que será utilizado pela luciferase e produção de luz. Este é registrado em um pirograma, e, posteriormente decodificado por softwares específicos (FIETTO; MACIEL, 2015; GUPTA; GUPTA, 2020).

O sequenciamento do tipo Illumina pode ser realizado por algumas plataformas tais como por exemplo, o HiSeq e MiSeq. O processo é dividido em quatro etapas: a primeira é a preparação da biblioteca. Nesta etapa ocorre a fragmentação (aleatória) do DNA ou cDNA e adaptadores de oligonucleotídeos são adicionadas as extremidades 5' e 3' (ILLUMINA, 2021). Posteriormente ocorre a formação de *clusters* de sequenciamento. Nesta etapa uma das extremidades do fragmento com adaptador é ligado a um “*flow cell*” ocorrendo a imobilização e hibridização desses fragmentos devido a densa camada de *primers* ligada ao *flow cell*, e em seguida, nucleotídeos não marcados serão incorporados de forma complementar ao fragmento, dando origem a amplificação em ponte (FIETTO; MACIEL, 2015; LIU *et al.*, 2010). Essa fita gerada será novamente desnaturada e o ciclo novamente é repetido até completar cerca de 35 ciclos (FIETTO; MACIEL, 2015). Uma vez que os *clusters* são formados se inicia a etapa de sequenciamento, onde ocorrerá a adição de terminadores reversíveis de didesoxinucleotídeos marcados com fluoróforos (ILLUMINA, 2021). As plataformas Illumina são capazes de gerar sequências de 100 a 300 pb permitindo uma grande economia de tempo e custo por base (AMARAL, 2019; CARVALHO; SILVA, 2010). Conforme Martins (2016) e KEHOE *et al.* (2014), o sequenciamento é uma técnica marcante, pois, propiciou o avanço da identificação e descoberta de novos genomas virais. Atualmente o HTS é comumente utilizado em diversos países para a diagnose viral, e para a obtenção de genomas completos de vírus de plantas, de maneira relativamente rápida, sem a necessidade de informações prévias da sequência do genoma (ADAMS *et al.*, 2009). De acordo com Pecman *et al.*, em 2017, com o sequenciamento HTS de nove amostras de diferentes plantas (*Brassica oleracea*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, dentre outras), foi possível detectar a presença de doze vírus e três espécies de viroide sendo uma entre as espécies virais considerada putativamente como nova espécie - cabbage cytorhabdovirus 1, do gênero *Cytorhabdovirus*. Outra nova espécie viral descoberta por HTS foi a *Alstroemeria yellow spot virus* (AYSV), um orthospovírus, que tem como hospedeira plantas de alstroemeria (HASSANI-MEHRABAN *et al.*, 2019). Atualmente inúmeros exemplos de novos genomas virais podem ser achados nas plataformas de busca de banco de dados.

5.0 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA PARA GENOMAS VIRAIS

A partir do sequenciamento HTS são obtidas milhares de sequências denominadas de *reads* (leituras), que são utilizados para a montagem de genomas através de ferramentas de bioinformática (MARTINS, 2016; BLAWID; SILVA; NAGATA, 2017). Os sequenciamentos geram uma biblioteca genômica. A qualidade dessa biblioteca deve ser verificada. Um exemplo de ferramenta de análise de qualidade comumente utilizada é o software FastQC (CHEN *et al.*, 2018). Este software analisará possíveis problemas na preparação da biblioteca e sequenciamento gerando gráficos em um relatório de diagnóstico, com onze itens verificados, tais como: o conteúdo de adaptadores, conteúdo de base N, conteúdo de sequência por base, distribuição de comprimentos de sequência, as estatísticas básicas, índices de qualidade por sequência, qualidade por base na sequência, qualidade por sequência em blocos, níveis de GC na sequência, níveis de duplicação de sequência e o conteúdo *kmer* (ANDREWS, 2010; BROWN; PIRRUNG; MCCUE, 2017). Posteriormente os *reads* também podem ser analisados através do software Kaiju (<http://kaiju.binf.ku.dk/>), um programa de rápida classificação taxonômica que faz a comparação entre os *reads* obtidos no sequenciamento e um banco de dados (refseq) através de alinhamento (MENZEL; NG; KROGH, 2016). Após a análise de qualidade, a remoção de contaminantes - restos de adaptadores, *barcodes* e *primers* em geral podem ser realizados por softwares que sejam capazes de fazer a leitura e corte dos mesmos, como por exemplo PRINSEQ ou Trimmomatic (THIESEN, 2015). O Trimmomatic (<http://www.usadellab.org>) é um algoritmo desenvolvido para filtragem e corte de leituras do tipo Illumina. O mesmo pode identificar a baixa qualidade do sequenciamento através de dois modos: modo simples, onde é removido contaminantes. Esse método é capaz de encontrar qualquer contaminante em qualquer posição da leitura. Também é possível remover contaminantes no modo palindrômico, onde o modo é especializado na remoção de adaptadores e é utilizado em sequências emparelhadas (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Em ambos os casos, é necessário que parâmetros de análise e filtragem sejam adicionados ao software, como por exemplo, a qualidade média exigida das sequências e o método de filtragem a ser empregado para o corte. Um dos métodos empregados é o *Sliding Window* (janela deslizante) – o mesmo analisa a extremidade 5' e corta (trimagem) a leitura quando a qualidade média dentro da janela está abaixo da exigida. Outros métodos também podem ser adicionados à análise como a filtragem em parâmetros do tipo *Leading* e *Trailing* que cortam bases ao início e final de leituras, respectivamente, quando as mesmas se encontram abaixo do limiar de qualidade escolhida (USADEL LAB, 2021).

Após a correção da qualidade, continua-se a análise com a montagem de *contigs* (sequência genômica contíguos formados a partir da sobreposição dos *reads* ou *kmers*), e para tanto, utiliza-se um montador genômico. Atualmente podemos encontrar disponíveis alguns montadores como, por exemplo, MIRA5 (CHEVREUX, 2018), ABySS (www.bcgsc.ca/platform/bioinfo/software/abyss/), VICUNA (YANG *et al.*, 2012), MEGAHIT (LI *et al.*, 2015), SPAdes (BANKEVICH *et al.*, 2012) e Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008). Montadores como, os dois últimos citados acima, utilizam os *kmers* (fragmento de nucleotídeos de comprimento *k*, exemplo, *k* = 3, ATG) para construir o grafo inicial *de Bruijn* (ZERBINO, 2010; MENÉS, 2017). Os mesmos, executam operações baseadas na estrutura do grafo, no comprimento das sequências e na cobertura para montagem dos *contigs* (BOMBASSARO, 2016). Nessa construção, cada nó representa uma série de *kmers*, onde um nó vai se sobrepor a outro (dois nós que se sobrepõem por *k-1* pb) e serão conectados por uma aresta (OLIVEIRA, 2021). No caso do montador SPAdes o mesmo possibilitará a utilização de diferentes tamanhos de *kmers*, onde inicialmente se constrói um gráfico de montagem com o menor valor de *k* e é feito o *input* das sequências resultantes e das demais leituras para a próxima interação do *k* de maior valor (método iterativo). Após as montagens, o SPAdes executa o programa de repetição e *scaffolding* (PRJIBELSKI *et al.*, 2020). Por fim os *contigs* são utilizados para realização de busca comparativa (tBLASTX ou Blastn) contra um banco de dados viral. Os genomas virais podem ser montados através de estratégias de montagem utilizando genomas de referência e/ou através da estratégia *de novo* (BLAWID; SILVA; NAGATA, 2017; PASZKIEWICZ; STUDHOLME, 2010).

Pela importância das doenças viróticas na cultura da melancia, principalmente pelas perdas de produção e econômicas que atualmente ocasionam nas áreas de produção do estado do Rio Grande do Norte e Ceará, este trabalho teve por objetivo diagnosticar e caracterizar as doenças virais associadas à melancia na região produtora de Mossoró e Ceará. Para tanto, amostras foliares com sintomas virais foram coletadas e submetidas a testes sorológicos, sendo posteriormente inoculadas em plantas de *N. benthamiana* que foram secas e encaminhadas ao instituto DSMZ para o sequenciamento de última geração (HTS). Por fim, a caracterização biológica e molecular também foi realizada com intuito de no futuro sugerir medidas promissoras de controle viral na cultura da melancia.

6.0 REFERÊNCIA

ABDALLA, O. A. *et al.* First Confirmed Report of Tobacco ringspot virus in Cucurbits Crops in Oklahoma. **Plant Disease**, Minnesota, v.96, p. 1.705, 2012. DOI <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0629-PDN>.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology: chapter fourteen - Plant diseases caused by viruses**. 5th ed. Amsterdã: ELSEVIER, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/tospoviruses>. Acesso em: 01 feb. 2021.

ADACHI-FUKUNAGA, S.; TOMITAKA, Y.; SAKURAI, T. Effects of melon yellow spot orthotospovirus infection on the preference and developmental traits of melon thrips, *Thrips palmi*, in cucumber. **PLoS ONE**, United States, v. 15, n. 6, p. 1–13, 2020. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233722>.

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. **Archives of Virology**, Wien, v. 150, n. 3, p. 459–479, 2005. DOI 10.1007/s00705-004-0440-6.

ADAMS, I. P. *et al.* Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 4, p. 537–545, 2009. DOI 10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x.

AGRISTAR. Folha Verde: Informativo da AGRISTAR do Brasil. Rio de Janeiro: AGRISTAR, 2013. Disponível em < <https://agristar.com.br/upload/pageflip/SET-OUT-2013-FINAL/989deb.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2021.

AGUIAR, R. W. S. *et al.* Damage and symptoms associated with watermelon virus in the state of Tocantins, Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 29, n. 5, p. 1632–1639, 2013.

ALI, A. *et al.* Occurrence of Viruses Infecting Watermelon, Other Cucurbits, and Weeds in the Parts of Southern United States. **Plant Health Progress**, United States, v.13, n. 1, p. 9, 2012. DOI 10.1094/PHP-2012-0824-01-RS.

ALENCAR, N. E. *et al.* Identificação biológica e molecular de vírus detectados em espécies de cucurbitáceas provenientes do Estado do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 3, n. 1, p. 32-37, 2012.

ALMASI, M. A.; ALMASI, G. Colorimetric immunocapture loop mediated isothermal amplification assay for detection of Impatiens necrotic spot virus (INSV) by GineFinder dye. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, n. 2, p. 533–538, 2018.

AMARAL M. N. S. **Caracterização biológica e filogenética de uma amostra de Vaccinia virus silvestre - SPAn232 (SAV)**. 2019, 52 f. Monografia (Especialista em Microbiologia Aplicada). Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, 2019.

ANDREWS, S. A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em :16. maio. 2021.

ANDREJEVA, J. *et al.* Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus

transmission and accumulation. **Journal of General Virology**, United Kingdom, v. 80, n. 5, p. 1133–1139, 1999.

AROCHA, Y. *et al.* First report of the identification of Moroccan watermelon mosaic virus in papaya in Democratic Republic of Congo. **Plant Pathology**, v.57, n. 2, p. 387, 2008. DOI 10.1111/j.1365-3059.2007.01658.x .

ASSIS FILHO, F. M. *et al.* Dynamics of Tomato spotted wilt virus replication in the alimentary canal of two thrips species. **Phytopathology**, v. 92, n. 7, p. 729–733, 2002. DOI <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.7.729> .

ASSIS FILHO, F. M. *et al.* Midgut infection by tomato spotted wilt virus and vector incompetence of *Frankliniella tritici*. **Journal of Applied Entomology**, v. 129, n. 9-10, p.548-550, 2005. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2005.01006.x>.

ASSIS, J. G. A. **Caracterização isoenzimática e variabilidade genética de populações de melancia (*Citrullus lanatus*) do Nordeste brasileiro**. 1999, 76 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

ASSIS, J. G. A. *et al.* Recursos genéticos de cucurbitáceas convencionais e subutilizadas no estado da Bahia, Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n.4, p. 323-331, 2012.

AVGELIS, A.D. Watermelon necrosis caused by a strain of Melon necrotic spot virus. **Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 618-22, 1989. DOI 10.1111/j.1365-3059.1989.tb01461.x.

BACHMAN, J. **Chapter 2: Reverse-transcription PCR (RT-PCR)**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2013. V. 530. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6> .

BAKER, C.; WEBB, S.; ADKINS, S. Squash Vein Yellowing Virus, Causal Agent of Watermelon Vine Decline in Florida 1. Florida Department of Agriculture. & Consumer Services Division of Plant Industry, 2008 (Plant Pathology Circular n. 407). Disponível em: <https://www.fdacs.gov/content/download/11413/file/pp407.pdf>. Acesso em: 04 mai. 2021.

BANANEJ, K. *et al.* First Report of Cucumber vein yellowing virus, Cucumber, Melon, and Watermelon in Iran. **Plant Disease**, Minnesota, v. 90, n. 8, p. 1113, 2006.

BÂNDEA, C. I. A. new theory on the origin and the nature of viruses. **Journal of Theoretical Biology**, United States, v. 105, n. 4, p. 591–602, 1983.

BANKEVICH, A. *et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012. DOI 10.1089/cmb.2012.0021.

BECK, T. F.; MULLIKIN, J. C.; BIESECKER, L. G. Systematic evaluation of sanger validation of next-generation sequencing variants. **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 647–654, 2016. DOI 10.1373/clinchem.2015.249623Z.

BISOGNIN, D. A. Origin and evolution of cultivated Cucurbits. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p.715-723, 2002. DOI <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000400028>.

BLANCARD, D. *et al.* **Tomato Diseases: Identification Biology and Control**. 2th ed. London: Manson Publishing, 2012.

- BLAWID, R.; SILVA, J. M. F.; NAGATA, T. Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline. **Annals of Applied Biology**, v. 170, n. 3, p. 301–314, 2017. DOI <https://doi.org/10.1111/aab.12345>.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BOMBASSARO, A. **Análise parcial do genoma de *Fonsecaea monophora* E estabelecimento de protocolo para cariotipagem do gênero**. 2016, 101f. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- BROWN, J. K *et al.* Widespread Outbreak of Cucurbit yellow stunting disorder virus in Melon, Squash, and Watermelon Crops in the Sonoran Desert of Arizona and Sonora, Mexico. **Plant Disease**, Minnesota, v. 91, n. 6, p.773, 2007. DOI <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0773A> .
- BROWN, J.; PIRRUNG, M.; MCCUE, L. A. FQC Dashboard: Integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. **Bioinformatics**, v. 33, n. 19, p. 3137–3139, 2017. DOI 10.1093/bioinformatics/btx373.
- CARDOSO, M. O. *et al.* Doenças das Cucurbitáceas no Estado do Amazonas. Manaus: EMBRAPA, 2001. 14 p. (Circular técnica, 9). Disponível em:< <https://core.ac.uk/download/pdf/15430719.pdf>>. Acesso: 02 fev. 2021
- CARRINGTON, J. C.; JENSEN, P. E.; SCHAAD, M. C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. **Plant Journal**, v. 14, n. 4, p. 393–400, 1998. DOI:10.1046/j.1365-313x.1998.00120.x.
- CARVALHO, M. C.; SILVA, D. C. G. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735–744, 2010.
- CARVALHO, R. N. Cultivo de melancia para a agricultura familiar. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1999. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/88278/cultivo-de-melancia-para-a-agricultura-familiar>>. Acesso: 02 jun. 2021.
- CEAGESP. Melancia *Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai: Normas de classificação. 2021. Disponível em: <http://ceagesp.gov.br/wp-content/uploads/2015/07/melancia.pdf>. Acesso em: 29 set. 2021.
- CHALAM, C. V. *et al.* Modern technologies for the diagnosis and assay of plants viruses. **Applied Plant Virology**, p. 69-77, 2020. DOI: 10.1016/b978-0-12-818654-1.00005-0.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113–116, 1993. DOI <https://doi.org/10.1007/BF02670468>.
- CHAUHAN, P. *et al.* A systematic review of conventional and advanced approaches for the control of plant viruses. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 89-98, 2019.
- CHEN, C. C. *et al.* A chlorotic spot disease on Calla lilies (*Zantedeschia* spp.) is caused by a tospovirus serologically but distantly related to Watermelon silver mottle virus. **Plant Disease**, Minnesota, v. 89, n. 5, p. 440–445, 2005. DOI 10.1094/PD-89-0440.

CHEN, S. *et al.* Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, 2018. DOI 10.1093/bioinformatics/bty560.

CHEN, T. C. *et al.* Melon yellow spot virus in watermelon: a first record from Taiwan. **Plant Pathology**, v. 57, n. 4, p.765, 2008. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01791.x> .

CHEN, T. C. *et al.* Genomic characterization of Calla lily chlorotic spot virus and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses. **Plant Pathology**, v. 61, n. 1, p. 183–194, 2012. DOI 10.1111/j.1365-3059.2011.02484.x.

CHEN, Y. *et al.* Entry of bunyaviruses into plants and vectors. **Advances in Virus Research**, p. 65–96, 2019. DOI 10.1016/bs.aivir.2019.07.001

CHEVREUX, B. **Sequence assembly and mapping with MIRA 5 The Definitive Guide**. 2018. Disponível em: <<http://mira-assembler.sourceforge.net/docs/DefinitiveGuideToMIRA.html>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

CHOI, G.S. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea. **The Plant Pathology Journal**, Korea, v.17, n. 5 p. 243 - 248, 2001.

CIFUENTES-MUÑOZ, N.; SALAZAR-QUIROZ, N.; TISCHLER, N. D. Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: Key structural units for virus cell entry and virus assembly. **Viruses**, v. 6, n. 4, p. 1801–1822, 2014. DOI 10.3390/v6041801.

CIUFFO, M. *et al.* A new Tospovirus sp. in cucurbit crops in Mexico. **Plant Disease**, Minnesota, v.93, n. 5, p. 467-74, 2009. DOI <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-5-0467>.

CIUFFO, M. *et al.* Identification of Dictyothrips betae as the vector of Polygonum ringspot virus. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 2, p. 299–307, 2010. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00428.x>.

CLARK, M. F.; LISTER, R. M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA Techniques. **Methods in Enzymology**, v. 118, n. C, p. 742–766, 1986. DOI [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18114-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18114-6).

CORREA, S. M. S. AFRICANIDADES NA PAISAGEM BRASILEIRA. **Revista Internacional Interdisciplinar Interthesis**, Florianópolis, v. 7, n. 1, p. 96-116, 2010. DOI <https://doi.org/10.5007/1807-1384.2010v7n1p96>.

COSTA, E. M. *et al.* Thrips collected in watermelon crops in the semiarid of Rio Grande do Norte, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, p. 575-577, 2014. DOI <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131322>.

COSTA, N. D.; LEITE, W. M. Potencial Agrícola do Solo para o Cultivo da Melancia. EMBRAPA Semiárido, Petrolina, 2007. CD – ROM 1. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/159191/1/OPB1322.pdf>>. Acesso em:13 mai. 2020.

CUI, H.; WANG, A. Plum Pox Virus 6K1 Protein Is Required for Viral Replication and Targets the Viral Replication Complex at the Early Stage of Infection. **Journal of Virology**, 2016. v. 90, n. 10, p. 5119–5131. DOI 10.1128/JVI.00024-16.

DALLAGNOL, L. J. Resistência genética de plantas a patógenos. Pelotas: Ed. UFPel, 2018. E – Book (437 p.). Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/bitstream/prefix/4207/1/RESIST%C3%80ANCIA%20GEN%C3%89TICA%20DE%20PLANTAS%20A%20PAT%C3%93GENOS_EBOOK.pdf>. Acesso: 03 mai. 2021.

DANE, F.; LIU, J. Diversity and origin of cultivated and citron type watermelon (*Citrullus lanatus*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 6, p. 1255–1265, 2007. DOI 10.1007/s10722-006-9107-3.

DECROLY, E. *et al.* Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 51–65, 2012. DOI 10.1038/nrmicro2675.

DENG, P.; WU, Z.; WANG, A. The multifunctional protein CI of potyviruses plays interlinked and distinct roles in viral genome replication and intercellular movement. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2015. DOI 10.1186/s12985-015-0369-2.

DIAS, R. C. S. *et al.* Sistema de produção de melancia. Petrolina: EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2010. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/cultivares.htm>>. Acesso em: 20 mai. 2021.

DIAS, R. C. S.; COSTA, N. D.; FARIA, C. M. B. Cultura da melancia. PETROLINA: EMBRAPA - CPATSA, Petrolina, p. 28, 1995. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/131876>>. Acesso em: 20 mai. 2021.

DIAS, R. C. S.; COSTA, N. D.; QUEIROZ, M. A.; FARIA, C. M. B. Cultura da melancia. Petrolina: EMBRAPA, 2001. 20 p. (Circular técnica, 63). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/152045>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

DIAS, R. C. S.; REZENDE, G. M. Sistema de Produção de Melancia. 2010. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 07 out. 2021.

DIAZ-MONTANO, J. *et al.* Onion thrips (Thysanoptera: Thripidae): A global pest of increasing concern in onion. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 1, p. 1–13, 2011. DOI 10.1603/EC10269.

DOEDERLEIN, T. A.; SITES, R. W. Host Plant Preferences of *Frankliniella occidentalis* and Thrips tabaci (Thysanoptera: Thripidae) for Onions and Associated Weeds on the Southern High Plains. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, n. 6, p. 1706–1713, 1993. DOI <https://doi.org/10.1093/jee/86.6.1706>.

DUIJSINGS, È.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. In vivo analysis of the TSWV mechanism: single base complementarity and primer length. **The EMBO Journal**, Alemanha, v. 20, n. 10, p. 2545–2552, 2008. DOI 10.1093/emboj/20.10.2545.

EDWARDSON, J. R. Electron Microscopy of Cytoplasmic Inclusions in Cells Infected with Rod-Shaped Viruses. **American Journal of Botany**, v. 53, n. 4, p. 359–364, 1966. DOI: <https://doi.org/10.2307/2439876>.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G.; KO, N. J. Potyvirus Cylindrical Inclusions – Subdivision IV. **Phytopathology**, v.74, n.1, p. 1111 – 1114, 1984. Disponível em:< https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1984Articles/Phyto74n09_1111.PDF>. Acesso em: 20 jun. 2021

EGEL, D.S.; ADKIN, S. Squash vein yellowing virus Identified in Watermelon (*Citrullus lanatus*) in Indiana. **Plant Disease**, Minnesota, v. 91, n. 8, p. 1056, 2007. DOI <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1056B>.

EMAUS, M. N. *et al.* Nucleic acid extraction: Fundamentals of sample preparation methodologies, current advancements, and future endeavors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 130, p. 115985, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115985>.

ESKELIN, K. *et al.* Potyviral VPg Enhances Viral RNA Translation and Inhibits Reporter mRNA Translation in Plants. **Journal of Virology**, v. 85, n. 17, p. 9210–9221, 2011. DOI 10.1128/JVI.00052-11.

EVANGELISTA, M. P. **Ocorrência, severidade e interação de vírus em plantas daninhas associadas à cultura da melancia**. 2012, 76 f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) - Universidade Federal de Tocantins, Gurupi, 2012.

FAO. WATERMELON. 2020. Disponível em:< <http://www.fao.org/land-water/databases-andsoftware/crop-information/watermelon/en/>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Sintomas de viroses em plantas. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2017. 13 p. (circular técnica, 202). Disponível em:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1084312/1/ComunicadoTecnico202.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2020.

FARKAS, D. H., HOLLAND, C. A. **Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation** in: Cell and Tissue Based Molecular Pathology, p. 19-32, 2009. DOI 10.1016/B978-044306901-7.50008-0.

FERREIRA, M. A. J. F. *et al.* Correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente entre dez caracteres de melancia e suas implicações para o melhoramento genético. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 21, n. 3, p. 438-442, 2003. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362003000300004>.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**, p. 27–64, 2015 Disponível em: < <http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/Sequ%C3%Aancia%20genomas.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2021.

FONTES, M. G. **Estudo da interação tospovírus – tomateiro: Análise transcriptômica, espectro da resistência no acesso ‘PI 203230’ e identificação de novas hospedeiras de Groundnut ringspot virus (GRSV)**. 2017, 214 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

FRELLSEN, J.; MENZEL, P.; KROGH, A. 6.03 - 6.03 - Algorithms for Mapping High-Throughput DNA Sequences*. **Comprehensive Biomedical Physics**, v. 6, p. 41-50, 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53632-7.01103-5>.

GADHAVE, K. R. *et al.* Aphid transmission of potyvirus: The largest plant-infecting RNA virus genus. **Viruses**, v. 12, n. 7, p. 1–22, 2020. DOI 10.3390/v12070773.

GALLET, R. *et al.* Small Bottleneck Size in a Highly Multipartite Virus during a Complete infection Cycle. **Journal of Virology**, v. 92, n. 14, p. 1–14, 2018. DOI <https://doi.org/10.1128/jvi.00139-18>.

GEERTS-DIMITRIADOU, C. *et al.* Analysis of the tomato spotted wilt virus ambisense s RNA-encoded hairpin structure in translation. **PLoS ONE**, United States, v. 7, n. 2, p. 1–12, 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0031013.

GOMES, A.; KORF, B. R. **Genetic Testing Techniques. Pediatric Cancer Genetics**. In: ROBIN, N. H.; FARMER, M. B. *Pediatric Cancer Genetics*. 1st ed. [S.l.]: Elsevier Inc, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3>. Acesso em: 20 jun. 2021.

GONSALVES, D. *et al.* *Papaya ringspot virus*. The Plant Health Instructor, 2010. DOI 10.1094/PHI-I-2010-1004-01. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/PapayaRingspotvirus.aspx>>. Acesso em: 20 fev. 2021.

GONZALEZ, R. *et al.* Mutagenesis scanning uncovers evolutionary constraints on tobacco etch potyvirus membrane-associated 6K2 protein. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 4, p. 1207–1222, 2019. DOI <https://doi.org/10.1093/gbe/evz069>.

GOUVEIA, G. *et al.* Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 6, p. 649 - 654, 2011.

GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-generation sequencing: Methodology and application. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 8, p. e11-4, 2013. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.248>.

GRAY, S. M; BANERJEE, N. Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 128-148, 1999.

GU, Q. S. *et al.* First Report of Cucurbit chlorotic yellows virus in Cucumber, Melon, and Watermelon in China. **Plant Disease**, Minnesota, v.95, p.73-73, 2011. DOI <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0550>.

GUPTA, A. K., & GUPTA, U. Next generation sequencing and its applications. In: VERMA, A. S.; SINGH, A. **Animal Biotechnology**, 2nd ed. [S.l.]: Elsevier Inc, 2020. DOI 10.1016/b978-0-12-811710-1.00018-5.

GUU, T. S. Y.; ZHENG, W.; TAO, Y. J. Bunyavirus: Structure and Replication. In: RAO, R. M., V. **Viral Molecular Machines, Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S.l.]. Boston: Springer, 2012. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_11.

HAAN, P. *et al.* Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal of General Virology**, v. 71, n. 9, p. 2207-2216, 1991. DOI 10.1099/0022-1317-72-9-2207.

HAJMORAD, M. R. *et al.* NIa and NIb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. **Virology**, v. 224, n. 2, p. 368–379, 1996. DOI 10.1006/viro.1996.0544.

HALFELD-VIEIRA, B. A. *et al.* Identificação sorológica de espécies de potyvirus em melancia, no estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 687-689, 2004. DOI 10.1590/S0100-41582004000600018.

HAN, J. *et al.* Vector Competence of Thrips Species to Transmit Soybean Vein Necrosis Virus. **Frontiers in Microbiology**, 2019. DOI <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00431>.

HASSANI-MEHRABAN, A. *et al.* A distinct tospovirus causing necrotic streak on *Alstroemeria* sp. in Colombia. **Archives of Virology**, v. 155, n. 3, p. 423–428, 2010. DOI 10.1007/s00705-010-0590-7.

HASSANI-MEHRABAN, A. *et al.* *Alstroemeria* yellow spot virus (AYSV): a new orthotospovirus species within a growing Eurasian clade. **Archives of Virology**, v. 164, n. 1, p. 117–126, 2019. DOI 10.1007/s00705-018-4027-z.

HODGES, D. M.; LESTER, G. E. CHAPTER 7: Cucurbits [Cucumber, Melon, Pumpkin and Squash]. In: TERRY, L. A. **Health-promoting properties of fruit and vegetables**. [S.l.]. London: British Library, 2011. DOI 10.1079/9781845935283.0118.

HORA, R.C.; CAMARGO, J.; BUZANINI, A.C. Cucurbitáceas e outras. In: BRANDÃO FILHO, J.U.T *et al.* Hortaliças-fruto [online]. Maringá: EDUEM, 2018. DOI <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0005>.

HULL, R. Nomenclature and Classification of Plant Viruses. 4th ed. [S.l.], 2002. DOI 10.1016/b978-012361160-4/50053-0.

HULL, R.; CENTER, J. I. Plant virology. 5th ed. Norwich: Academic press, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção Agrícola: Lavoura Temporária. 2020. Disponível em <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/14/0>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV. ICTV 9th Report (2011): Bunyaviridae. 2020. Disponível em <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses_2011/w/negrna_viruses/205/bunyaviridae>. Acesso em :31 dez. 2020.

ICTV. Genus: *Potyvirus*. 2018. Disponível em <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/potyviridae/572/genus-potyvirus>. Acesso em: 16 abr. 2020.

ILLUMINA. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2021. Disponível em: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/product-s/illumina_sequencing_introduction.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2021.

IWAKI, M. *et al.* Silver mottle disease of Watermelon caused by *Tomato spotted wilt virus*. **Plant Disease**, Minnesota, v.68, p. 1006 – 1008, 1984. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n11_1006.pdf . Acesso em: 04 Jun. 2021.

JEFFREY, C. A review of the Cucurbitaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society, Richmond**, v.81, n. 3, p. 233-247, 1980. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1980.tb01676.x>.

KALLESHWARASWAMY, C. M.; KUMAR, N. K. Transmission efficiency of Papaya ringspot virus by three aphid species. **Phytopathology**, v. 98, n. 5, p. 541–546, 2008. DOI 10.1094/PHYTO-98-5-0541.

KEHOE, M. A. *et al.* Plant virology and next generation sequencing: Experiences with a Potyvirus. **PLoS ONE**, United States, v. 9, n. 8, 2014. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104580>.

KELLER, K. E. *et al.* Potyvirus Genome-Linked Protein (VPg) Determines Pea Seed-Borne Mosaic Virus Pathotype-Specific Virulence in *Pisum sativum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 6, p. 124–130, 1988. DOI 10.1094/MPMI.1998.11.2.124.

KIKKERT, M. *et al.* Tomato Spotted Wilt Virus Particle Morphogenesis in Plant Cells. **Journal of Virology**, United States, v. 73, n. 3, p. 2288–2297, 1999. DOI <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.2288-2297.1999>.

KITAJIMA, E. W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 20, n. 2, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/16760611-BN-2019-0932>.

KLESSER, P. J. *Groundnut ringspot virus* - A new sap-transmissible virus of *Arachis hypogaea* and *A. monticola*. **South African Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 3, p.711-720, 1966. DOI https://hdl.handle.net/10520/AJA05858860_258PDF.

KNUHTSEN, H.; HIEBERT, E.; PURCIFULL, D. E. Partial purification and some properties of tobacco etch virus induced intranuclear inclusions. **Virology**, v. 61, n. 1, p. 200–209, 1974. DOI [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90254-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90254-2).

KORMELINK, R. *et al.* Viral synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants. **Journal of General Virology**, v.73, p. 687-693, 1992. DOI 10.1099/0022-1317-73-3-687.

KORMELINK, R. *et al.* The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2795–2804, 1993.

KOUSIK, C. S. *et al.* Progress and challenges in managing watermelon vine decline caused by whitefly-transmitted Squash Vein Yellowing Virus (SqVYV). **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 60, n. 4, p. 435–445, 2012. DOI 10.1560/IJPS.60.4.435.

LAZAROWITZ, S.G.; LAZDINS, I.B. Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a bipartite Squash leaf curl geminivirus with a broad host range phenotype. **Virology**, v. 180, n. 1, p. 58-69, 1991. DOI 10.1016/0042-6822(91)90009-z.

LAW, M. D.; SPECK, J.; MOYER, J. W. The M RNA of impatiens necrotic spot Tospovirus (Bunyaviridae) has an ambisense genomic organization. **Virology**, v. 188, n. 2, p. 732–741, 1992.

LEÃO, E. U. *et al.* *Citrillus lanatus* is a new natural host of Groundnut ringspot virus in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Alemanha, v. 163, n. 11-12, p. 1014-1018, 2015. DOI 10.1111/jph.12327.

LEÃO, E. U. **Caracterização do Groundnut ringspot virus (GRSV) e seu vetor (Frankliniella schultzei) em melancia**. 2015, 58 f. Tese (Doutorado em Agronomia- Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2015.

LEASTRO, M. O. **Estudo Funcional da Proteína de Movimento (NSm) de distintos Tospovirus**. 2015, 122 f. Tese (Doutor em Biologia celular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

LECOQ, H. *et al.* Survey on cucurbit viruses in Kordofan, east and central regions of Sudan. University of Khartoum. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, n. 2, p. 67-81, 1994.

LI, D. *et al.* MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 2015. DOI <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>.

LI, J. T. *et al.* Complete genomic sequence of watermelon bud necrosis virus. **Archives of Virology**, v. 156, p. 359–362, 2010. DOI 10.1007/s00705-010-0881-z.

LI, K. P. *et al.* Cytogenetic relationships among *Citrullus* species in comparison with some genera of the tribe Benincaseae (Cucurbitaceae) as inferred from rDNA distribution patterns. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016. DOI <<http://dx.doi.org/10.1186/s12862-016-0656-6>>.

LIMA, A. F. C. **Sequenciamento completo e caracterização genética dos vírus MIS 0397 e INHRR 17a-10 (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) isolados no Peru e na Venezuela**. 2015, 134 f. Dissertação (Mestrado em virologia) – Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, 2015.

LIMA, J.A.A.; AMARAL, M.R.G. Purification and serology of squash mosaic virus isolated from watermelon. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 3, p. 605-11, 1985. Disponível em:< <https://www.cabi.org/isc/abstract/19861317013>>. Acesso em: 20. out. 2020.

LIMA J. A. A. *et al.* Viruses Infecting Melon and Watermelon in Northeastern Brazil. **Virus Reviews & Research**, v.17, p. 1-2, 2012. DOI:0.17525/vrr.v17i1-2.60

LIMA, M. F.; DIAS, R. C. S. D. Epidemia de Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) na cultura da melancia no Brasil Central. In: XLVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia; Simpósio Brasileiro de mofo branco, 47., 2014, Brasília. **Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Brasília: SBF, 2014. CD_ROM. Disponível em < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/118629/1/636-Freitas-3.pdf>. >. Acesso em: 16 dez. 2020.

LIMA, M.F.; BARBOSA, L.F.; de ÁVILA, A.C. Levantamento de viroses na cultura da melancia na região do Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 337, 1997. Disponível em:< <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/132386>>. Acesso em: 17 dez. 2020.

LIMA, R. C. A. *et al.* Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 689–702, 2001. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000400001>.

LISA, V. *et al.* Characterization of a Potyvirus that causes Zucchini yellow mosaic. **Phytopathology**, v. 71, p. 667- 672, 1981. DOI 10.1094/Phyto-71-667.

LIU, E. T. *et al.* Genomic Technologies for Systems Biology. **Systems biomedicine**. 2010. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372550-9.00002-X>.

LI, X. H. *et al.* Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). **Journal of Virology**, v. 71, n. 2, p. 1598–1607, 1997. DOI 10.1128/JVI.71.2.1598-1607.1997.

LOPES, C. A.; REIS, A.; LIMA M. F. Principais Doenças da Cultura da Melancia no Brasil. Brasília: EMBRAPA, 2008. 10 p. (Circular técnica, 61). Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/145915/1/ct-61.pdf>>. Acesso em:03 fev. 2021.

LÓPEZ-MOYA, J. J.; GARCÍA, J. A. Potyviroses. *in*: **Encyclopedia of Virology**. 3th ed., 2008. E-Book. ISBN 9780123739353. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/potyriviruses>. Acesso em:07 jul. 2021.

MAIA, I. G.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 7, p.1335-134, 1996. DOI 10.1099/0022-1317-77-7-1335.

MALLICK, M. F. R.; MASUI, M. Origin, distribution and taxonomy of melons. **Scientia Horticulturae**, v. 28, n. 3, p. 251–261, 1986. DOI [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(86\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0304-4238(86)90007-5).

MARMIROLI, N.; MAESTRI, E. Polymerase chain reaction (PCR) *In*: **Food Toxicants Analysis - Techniques, Strategies and Developments**, [S. l.]: Elsevier Science, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/multiplex-polymerase-chain-reaction>. Acesso em:03 fev. 2021.

MARTINS T. P. **Identificação de vírus em tomateiro através de análise por sequenciamento de alto desempenho**. 2016, 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

MENÉS, A. M. **Avaliação da qualidade da montagem de fragmentos de sequências biológicas**. 2017, 61 f. Dissertação (Mestrado Informática) – Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

MEDEIROS, R. B. *et al.* Virologia vegetal: Conceitos, fundamentos, classificação e controle. 1. ed. Brasília: UNB, 2015.

MENZEL, P.; NG, K. L.; KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, 2016. DOI 10.1038/ncomms11257.

MIR, M. A.; PANGANIBAN, A. T. The bunyavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone: Possible roles in viral RNA panhandle formation and genome replication. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, RNA, v.12, n. 2, p. 272 - 282, 2006. DOI 10.1261/rna.2101906.

MORITZ, G.; KUMM, S.; MOUND, L. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. **Virus Research**, v. 100, n. 1, p. 143–149, 2004. DOI <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.022>.

MORTAZAVI, N.; ALEOSFOOR, M.; MINAEI, K. Transmission of cineraria isolate of tomato yellow ring virus by *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera, Thripidae). **Linzer biologische beitrage Journal**, v.45, n.2, p. 2011–2018, 2013.

MOU, D. *et al.* Transmission mode of watermelon silver mottle virus by *Thrips palmi*. **PLoS ONE**, United States, v. 16 n. 3, p. 1–14, 2021. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247500>.

MOURY, B.; DESBIEZ, C. Host range evolution of potyviruses: A global phylogenetic analysis. **Viruses**, v. 12, n. 1, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/v12010111>.

NADALA, E. C. B.; LOH, P. C. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. **Journal of Virological Methods**, v. 84, n. 2, p. 175–179, 2000. DOI 10.1016/S0166-0934(99)00140-8.

NAGATA, T. *et al.* The transmission specificity and efficiency of tospoviruses. In: *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*, 45-46, 2002, Canberra. **Australian National Insect Collection**: Canberra, 2002. Disponível em: <<https://www.ento.csiro.au/thysanoptera/Symposium/Section2/4-Tatsuya-et-al.pdf>>. Acesso em: 04 fev. 2021.

NAGATA, T.; ÁVILA, A. C. Transmission of Chrysanthemum Stem Necrosis Virus, a Recently Discovered Tospovirus, by Two Thrips Species. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 2, p. 123–123, 2000. DOI 10.1046/j.1439-0434.2000.00475.x.

NAGATA, T. *et al.* First report on natural occurrence of Zucchini lethal chlorosis tospovirus on Cucumber and Chrysanthemum stem necrosis tospovirus on Tomato in Brazil. **Plant disease**, Minnesota, v. 82, n. 12, p. 1,403, 1998. DOI 10.1094/PDIS.1998.82.12.1403A.

NAGATA, T. *et al.* The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. **Plant Pathology**, v. 53, n. 2, p. 136–140, 2004. DOI <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.00984.x>.

NAGUYEN M.; HAENNI, A. L. Expression strategies of ambisense viruses. **Virus Research**, v.93, n. 2, p. 141-150, 2003. DOI [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00094-7).

NAKAHARA, S.; MONTEIRO, R. C. *Frankliniella zucchini* (Thysanoptera: Thripidae), a new species and vector of Tospovirus in Brazil. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 101, n. 2, p. 290-294, 1999. Disponível em: <<https://www.biodiversitylibrary.org/page/16194615#page/299/mode/1up>>. Acesso em: 20 mar. 2021.

NAYIK, G. A.; GULL A. Antioxidants in Fruits: Properties and Health Benefits. 1st ed. Springer: Singapore, 2020. p. 334-337.

NELSON, M. R.; WHEELER, R. E. Watermelon: A local lesion host, and cocklebur: A systemic host of an Alfalfa Mosaic virus strain. In: **Plant Disease Report**. 7-12 ed. Washington, D.C.: Bureau of Plant Industry, 1976. p. 639-642. Disponível em: <https://books.google.com.br/books> . Acesso em: 20 jan. 2021.

NEOPROSPECTA Sequenciamento de nova geração - NGS. 2016. Disponível em: <<https://blog.neoprospecta.com/sequenciamento-de-nova-geracao-ngs/>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

NIGAM, D.; GARCIA-RUIZ, H. Variation profile of the orthospovirus genome. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 1–28, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/pathogens9070521>.

NKRUMAH-ELIE, Y.; ELIE, M.; REISDORPH, N. Systems Biology Approaches to Asthma Management. In: SZEFLER, S.; WECHSLER, F. H. M. **Personalizing Asthma Management for the Clinician**, 1st ed. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 151-160. DOI [sci-hub.se/10.1016/B978-0-323-48552-4.00014-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48552-4.00014-7).

OHNISHI, J. *et al.* *Frankliniella cephalica*, a New Vector for Tomato spotted wilt virus. **Plant Disease**, Minnesota, v. 90, n. 5, p. 685 - 685, 2006. DOI <https://doi.org/10.1094/PD-90-0685B>.

OLIVEIRA, A. L. Metodologias para Construção de Genomas. 2021. Disponível em: <<https://paca.ime.usp.br>>. Acesso em: 08 jun. 2021.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (hemiptera: cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. **Neotropical Entomology**, v. 31, n.2, p. 225-231, 2002. DOI <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000200008>.

OLIVEIRA, A. S. **Bean necrotic mosaic virus: um novo e distinto tospovírus brasileiro**. 2011, 55 f. Dissertação (Mestrado em Biologia molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

OLIVER, J. E.; WHITFIELD, A. E. The Genus Tospovirus: Emerging Bunyaviruses that Threaten Food Security. **Annual Review of Virology**, v. 3, p. 101–124, 2016. DOI [10.1146/annurev-virology-100114-055036](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055036).

OLKAR, S. K. *et al.* Watermelon bud necrosis orthospovirus - An emerging constraint in the Indian subcontinent: An overview. **Crop Protection**, v. 117, n. 2018, p. 52-62, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.11.005>.

OLSPERT, A. *et al.* Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae. **EMBO reports**, v. 16, n. 8, p. 995–1004, 2015. DOI [10.15252/embr.201540509](https://doi.org/10.15252/embr.201540509).

ORÍLIO, A. F. **Caracterização de uma nova espécie de Potyvirus infectando mandioquinha-salsa**. 2007, 105 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

OSS-VAN, C. J.; GOOD, R. J.; CHAUDHURY, M. K. Mechanism of DNA (southern) and protein (western) blotting on cellulose nitrate and other membranes. **Journal of Chromatography A**, v. 391, p. 53–65, 1987. DOI [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94304-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94304-3).

PAPPU, H. R.; JONES R. A. C.; JAIN R. K. Global status of Tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. **Virus Research**, Amsterdam, v. 141, n. 2, p. 219-36, 2009. DOI [10.1016/j.virusres.2009.01.009](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.009).

PARK, F. D.; SASIK, R.; REYA, T. Microarrays: An Introduction and Guide to Their Use. In: JALALI, M.; SALDANHA, F. Y. L.; JALALI, M. **Basic Science Methods for Clinical Researchers**. [S.l.]. Cambridge: Academic Press, 2017. p. 57-76. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00004-7>.

PARRELLA, G. *et al.* An update of the host range of tomato spotted wilt virus. **Journal of Plant Pathology**, v. 85, n. 4, p.227-264, 2003.

PASZKIEWICZ, K.; STUDHOLME, D. J. De novo assembly of short sequence reads. **Briefings in Bioinformatics**, v. 11, n. 5, p. 457-472, 2010. DOI <https://doi.org/10.1093/bib/bbq020>.

PAVAN, M. A. *et al.* Viroses. In: BRANDÃO FILHO, J.U.T. *et al.* **Comps. Hortalças-fruto** [online]. Maringá: EDUEM. 2018. p. 241-269. DOI <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0009>.

PENSABIO. Conheça os diferentes tipos de ELISA. 2021. Disponível em:< <https://www.pensabio.com.br/post/2019/03/21/conheca-os-diferentes-tipos-de-elisa>>. Acesso em:05 jun. 2021.

PEREIRA, A. S. **Influência de épocas de cultivo na determinação de fatores de perdas na cultura da melancia**. 2012, 68 f. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Tocantins, Gurupi, 2012.

PEREIRA, A. O. *et al.* GUIA PRÁTICO PARA O CULTIVO DE MELANCIA. 2019. Disponível em< <https://central3.to.gov.br/arquivo/477358/>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

PIRONE, T. P.; PERRY, K. L. Aphids: Non-persistent transmission. In: **Botanical Research**, 2002. p. 1-19.DOI 10.1016/s0065-2296(02)36056-7.

PITMAN, T. L. *et al.* Report of Watermelon Green Mottle Mosaic Virus in North America. **Plant Disease**, v.103, p.3288, 2019. DOI <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0308-PDN>.

POLSTON, J.E. *et al.* First Report of Cucurbit yellow stunting disorder virus in Cucurbits in Florida. **Plant Disease**, Minnesota, v. 92, n. 8, p. 1251, 2008. DOI <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-8-1251B>.

PLISSON, C. *et al.* Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 23753–23761, 2003. DOI 10.1074/jbc.M302512200.

PREMACHANDRA, W. T. S. D. *et al.* Ceratothripoides claratris, a new vector of a Capsicum chlorosis virus isolate infecting tomato in Thailand. **Phytopathology**, v. 95, n. 6, p. 659–663, 2005. DOI <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0659>.

PRJIBELSKI, A. *et al.* Using SPAdes De Novo Assembler. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 70, n. 1, p. 1-29, 2020. DOI <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>.

PURCIFULL, D. E. *et al.* Partial characterization of a distinct potyvirus isolated from watermelon in Florida. **Plant Disease**, v. 82, n. 12, p. 1386–1390, 1998. DOI 10.1094/PDIS.1998.82.12.1386.

QUEIROZ, A. P. **Tripes (Thysanoptera: Thripidae): Identificação de espécies e vírus associado à cultura da melancia**. 2015, 97 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi - To, 2015.

QUIRINO, M. S. **Detecção e análise filogenética de vírus em melancia e construção de novos vetores virais para expressão de proteínas em células de inseto**. 2015, 173 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade Federal de Brasília, Brasília – DF, 2015.

RAO, X.; LIU, Y.; LI, Y. First report of natural infection of watermelon-by-Watermelon silver mottle virus in China. **New Disease Reports**, v.24, p. 12, 2011. DOI <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.024.012>.

RAMOS, N. F.; LIMA, J. A. A.; GONÇALVES, M. F. B. Efeitos da interação de potyvirus em híbridos de meloeiro, variedades de melancia e abobrinha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 199-203, 2003. DOI 10.1590/S0100-41582003000200016.

REEN, D. J. Assay Immunosorbent. Walker J.M. (eds) Basic Protein and Peptide Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 32, 1994. DOI 10.1385/0-89603-268-x:461

REVERS, F.; GARCÍA, J. A. Molecular biology of potyviruses. 1st. ed. In: MARAMOROSCH, K.; METTENLEITER, T. **Advances in Virus Research** [S. l.]: Elsevier. 2015.

RILEY, D. G. *et al.* Thrips vectors of Tospoviruses. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2011. DOI <https://doi.org/10.1603/IPM10020>.

ROCHA, M. R. **Sistemas de cultivo para a cultura da melancia**. 2010, 76 f. Dissertação (Mestrado em ciência do solo) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, 2010.

RODAMILANS, B. *et al.* RNA Polymerase Slippage as a Mechanism for the Production of Frameshift Gene Products in Plant Viruses of the Potyviridae Family. **Journal of Virology**, v. 89, n. 13, p. 6965–6967, 2015.

RODRIGUES, A. M. **Ocorrência, distribuição e diagnose de viroses associadas à cultura da melancia no estado do Tocantins**. 2011, 97 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2011.

RODRIGUEZ-CEREZO, E.; SHAW, J. G. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. **Virology**, Estados Unidos, v. 185, n. 2, p. 572-579, 1991. DOI 10.1016/0042-6822(91)90527-i.

ROTENBERG, D. *et al.* Thrips transmission of Tospoviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 15, p. 80-89, 2015. DOI 10.1016/j.coviro.2015.08.003.

SALAS, F. J. S.; LOPES, J. R. S.; FERERES, A. Resistência de variedades comerciais de batata à transmissão do POTATO Y VIRUS PELO VETOR MYZUS PERSICAE*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 167–173, 2004. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V71_2/salas.PDF>. Acesso em: 15 set. 2020.

SA, P. B.; HIEBERT, E.; PURCIFULL, D. E. Molecular characterization and coat protein serology of watermelon leaf mottle virus (Potyvirus). **Archives of Virology**, v. 145, p.641-650, 2000. DOI 10.1007/s007050050053.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. DOI 10.1073/pnas.74.12.5463.

SANTOS, C. F. *et al.* Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **Journal of Applied Oral Science**, v. 1, n. 12, p. 1-11, 2004. DOI <https://doi.org/10.1590/S1678-77572004000100002>.

SANTOS, L. B. **Caracterização agronômica e físico-química de famílias de melancia tipo Crimson Sweet selecionados para reação de resistência ao *Papaya ringspot virus* (PRSV-W).** 2010. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2010.

SCHMALJOHN, C. S.; PATTERSON, J. L. Bunyaviridae and Their Replication. 2 th ed. Fields virology, New York, 1990. Disponível em <<https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a233383.pdf>> Acesso em: 28 dez. 2020.

SCHOCHETMAN, G.; OU, C. Y.; JONES, W. K. Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 158, n. 6, p. 1154-1157, 1988. DOI 10.1093/infdis/158.6.1154.

SELA, N. *et al.* A new cryptic virus belonging to the family Partitiviridae was found in watermelon co-infected with Melon necrotic spot virus. **Virus Genes**, v. 47, p. 382- 384, 2013. DOI 10.1007/s11262-013-0937-8.

SEVIK, M. A.; ARLI-SOKMEN, M. Estimation of the effect of Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection on some yield components of tomato. **Phytoparasitica**, v. 40, n. 1, p. 87–93, 2012. DOI 10.1007/s12600-011-0192-2.

SHEN, W. *et al.* The RNA-dependent RNA polymerase NiB of potyviruses plays multifunctional, contrasting roles during viral infection. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 77, 2020. DOI 10.3390/v12010077.

SHI, X. *et al.* Visualizing the Replication Cycle of Bunyamwera Orthobunyavirus Expressing Fluorescent Protein-Tagged Gc Glycoprotein. **Journal of Virology**, v.84, n. 17, p. 8460-8469, 2010. DOI 10.1128/JVI.00902-10.

SHUKLA, D. D.; WARD C. W. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. **Advances in Virus Research**, v. 36, p.273-314, 1989. DOI: 0.1016/s0065-3527(08)60588-6.

SILVA, M. L. **Caracterização morfológica e molecular de Acessos de Melancia [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai].** 2004, 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SIMMONS, H. E. *et al.* Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. **Virus Research**, v. 176, n. 1-2, p. 259-264, 2013. DOI 10.1016/j.virusres.2013.06.016.

SIMMS, D.; CIZDZIEL, P.; CHOMCZYNSKI, P. TRIzol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. **Focus**, v. 15, n. 4, p. 99-102, 1993.

SILVEIRA, L. M. *et al.* Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, n. 2, p. 123-126, 2009. DOI 10.1590/S1982-56762009000200008.

SINGH, S. J.; KRISHNAREDDY, M. Watermelon Bud Necrosis: A new tospovirus. **Acta Horticulturae**, p. 68-77, 1996. DOI <doi:10.17660/actahortic.1996.431.6>.

SOARES, M. G. O. *et al.* Ocorrência de patógenos em cultivos de melancia e abóbora no sertão da Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 11, n. 1, p. 07-13, 2016. DOI <https://doi.org/10.18378/rvads.v11i1.3704>.

SOUSA, V. F. *et al.* Tecnologias para a produção de melancia irrigada na Baixada Maranhense. **Tecnologias para a produção de melancia irrigada na Baixada Maranhense. EMBRAPA COCAIS**, 1. ed., p. 140, 2019. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1115205>>. Acesso em: 23 jan. 2021.

STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 153–187, 1989. DOI [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90394-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90394-3)

SUDEEP, S.; MITTER, N.; EID S.; PAPPU, H. R. Complementation between Two Tospoviruses Facilitates the Systemic Movement of a Plant Virus Silencing Suppressor in an Otherwise Restrictive Host. **Plos One**, United States, v. 7, n. 10, p. e44803, 2012. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044803>.

SUMIDA, C. H. Viral diseases of crops: a critical review. *In*: AWASTHI, L.P. **Applied Plant Virology Advances, Detection, and Antiviral Strategies**. 1st ed. [S. l.]: Elsevier, 2020. DOI 10.1016/b978-0-12-818654-1.00033-5.

SUN Y, *et al.* Bunyavirales ribonucleoproteins: the viral replication and transcription machinery. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 522-540, 2018.

TAKEDA, A. *et al.* Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. **FEBS Letters**, v. 532, n. 1-2, p. 75-79, 2002. DOI 10.1016/s0014-5793(02)03632-3.

TAN, S. H. *et al.* The genome structure of kyuri green mottle mosaic tobamovirus and its comparison with that of cucumber green mottle mosaic tobamovirus. **Archive of Virology**, v. 145, n. 6, p. 1067-1079, 2000. DOI 10.1007/s007050070110.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-10, 2009. DOI 10.1155/2009/574398

TAVARES, A. T. **Caracterização de isolados de vírus coletados em melancia no estado de Tocantins e sua sintomatologia em cucurbitáceas**. 2012. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2012.

TERÃO, D. *et al.* Identificação e manejo de doenças fúngicas da melancia. Jaguariúna: EMBRAPA, 2019. 15 p. (Comunicado técnico, 59). Disponível em:<

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198218/1/2019CT01.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

THIESEN, J. F. **Detecção de marcadores moleculares plastidiais para estudos filogenéticos e cpssrs específicos para orquídeas sapatinhos-de-vênus** (cyprapedioideae, orchidaceae). 2015, 111 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2015.

TOMCHINSKY, B.; MING, L. C. As plantas comestíveis no Brasil dos séculos XVI e XVII segundo relatos de época. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 70, 2019. DOI <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970040>

TRACHTENBERG, E. A.; HOLCOMB, C. L. Next-generation HLA sequencing using the 454 GS FLX system. **Methods in Molecular Biology**, v. 1034, p. 197-219, 2013. DOI 10.1007/978-1-62703-493-7_10.

ULLMAN, D. E.; CHO, J.; GERMAN, L. Occurrence and distribution of cucurbit viruses in the Hawaiian Islands. **Plant Disease**, Minnesota, v. 75, p. 367-370, 1991. DOI 10.1094/PD-75-0367.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, v. 74, n. 1-2, p. 157-175, 2001. DOI 10.1016/s0168-1702(01)00220-9.

USADEL LAB. Trimmomatic Manual: V0.32. 2021. Disponível em: <http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/TrimmomaticManual_V0.32.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2021.

VEGA, J.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A. Detecção do Vírus do mosaico amarelo da abobrinha de moita no Brasil: Caracterização parcial de um isolado encontrado em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p.72-79, 1995.

VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. **Journal of virology**, v. 69, n. 3, p. 1582-1590, 1995.

VIJAYAPALANI, P. *et al.* Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002639, 2012. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002639>.

VITRAL, C. L. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA). [2021]. Disponível em: <http://ole.uff.br/wp-content/uploads/sites/236/2017/12/apostila_elisa.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2021.

VIRALZONE. Unknown Taxon 11611. 2020. Disponível em <https://viralzone.expasy.org/253?outline=all_by_species> Acesso em: 23 ago. 2020.

VIRALZONE. Potyvirus. 2021. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/50?outline=all_by_species>. Acesso em: 31 mai. 2021.

VOLEER, A. *et al.* The Detection of Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Journal of General Virology**, v. 33, n. 1, p. 165-167, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-33-1-165>. DOI 10.1099/0022-1317-33-1-165.

- WANGAI, A. W. *et al.* Outbreak of Tomato spotted wilt virus in Tomato in Kenya. **Plant disease**, Minnesota, v. 85, n. 10, p.1123, 2001. DOI 10.1094/PDIS.2001.85.10.1123B.
- WEBB, R. E.; SCOTT, H. A. Isolation and identification of watermelon mosaic viruses 1 and 2. **Phytopathology**, Minnesota, v. 55, p. 895-900, 1965. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19661100318>. Acesso em: 04. 09.2020.
- WEBSTER, C. G. *et al.* Emergence of Groundnut ringspot virus and Tomato chlorotic spot virus in 2 vegetables in Florida and the southeastern U.S. **Phytopathology**, Minnesota, v. 105, n. 3, p. 388-398, 2015. DOI 10.1094/PHYTO-06-14-0172-R.
- WIJKAMP, I. *et al.* Transmission of tomato spotted wilt virus by *Frankliniella occidentalis*; median acquisition and inoculation access period. **Annals of Applied Biology**, v. 129, n. 2, p. 303-313, 1996. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1996.tb05753.x>.
- WILSON, H. J.; GOODMAN, R. M.; ISRAEL, H. W. Pinwheel inclusions in morphogenesis: A possible alternative to induction by viruses. **Archives of Virology**, v. 51, n. 4, p. 347-354, 1976. DOI 10.1007/BF01317938.
- WHITFIELD, A. E.; ULLMAN, D. E.; GERMAN, T. L. Tospovirus – Thrips interactions. **Annual Review Phytopathology**, v. 43, p. 459-489, 2005. DOI 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140017.
- WU, H.J. *et al.* The rate of seed contamination and transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in watermelon and melon. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 44, n. 7, p. 1527-32, 2011. Disponível em: < <https://www.chinaagrisci.com/EN/Y2011/V44/I7/1527>>. Acesso em: 12 jun. 2021.
- XIN, M *et al.* The genomic and biological characterization of *Citrullus lanatus* cryptic virus infecting watermelon in China. **Virus Research**, v. 15, n. 232, p. 106-112, 2017. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.02.009>.
- XU, Z.; CHANG, L. Identification and Control of Common Weeds: Volume 3. v. 3. [S.l.]: Springer, 2017. p. 417-432. DOI 10.1007/978-981-10-5403-7.
- XU, Y. *et al.* Identification of *Taeniothrips eucharii* (Thysanoptera: Thripidae) as a vector of *hippeastrum* chlorotic ringspot virus in Southern China. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1597-1600, 2017. DOI 10.1094/PDIS-01-17-0045-RE.
- YANG, X. *et al.* De novo assembly of highly diverse viral populations. **BMC Genomics**, 2012. v. 13, n. 1, 2012. DOI 10.1186/1471-2164-13-475
- YAN, Z. Y. *et al.* Multiple aromatic amino acids are involved in potyvirus movement by forming π -stackings to maintain coat protein accumulation. **Phytopathology Research**, v. 3, n. 1, 2021. DOI 10.1186/s42483-021-00088-9.
- YUKI, V. A. *et al.* Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of Sao Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v. 84, n. 5, p. 516-520, 2000.
- ZERBINO, D. R. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. **Current Protocols in Bioinformatics**, n. SUPPL. 31, p. 1-12, 2010. DOI 10.1002/0471250953.bi1105s31.

- ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821-829, 2008. DOI 10.1101/gr.074492.107
- ZHAO, K.; ROSA, C. Thrips as the transmission bottleneck for mixed infection of two orthospoviruses. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 509, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/plants9040509>.
- ZHAO, L. L. *et al.* First report of tobacco curly shoot virus (tbcsv) and its associated satellites from watermelon in china. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 3, p. 761-764, 2017. DOI 10.4454/jpp.v99i3.3987.
- ZHENG, K. *et al.* Characterization of a New Orthospovirus from Chilli Pepper in Yunnan Province, China. **Plant disease**, Minnesota, v. 104, n. 4, p. 1175-1182. 2020. DOI 10.1094/pdis-09-19-1925-re.
- ZHENG, X. *et al.* Tripartite interactions between jasmonic/salicylic acid pathways, western flower thrips, and thrips-transmitted tomato zonal necrotic spot virus infection in *Capsicum annuum*. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 13, n. 2, p. 289-297, 2019. DOI 10.1007/s11829-019-09683-2.
- ZIMMERMANN, J. *et al.* Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. **FEBS Letters**, v. 233, n. 2, p. 432-436, 1988. DOI 10.1016/0014-5793(88)80477-0.

CAPÍTULO II

Caracterização biológica e molecular do Groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) da melancia

CAPÍTULO II

Caracterização biológica e molecular do Groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) da melancia

Tatiane Santos da Silva¹, Alejandro Risco Mendoza¹, Paolo Margaria², Stephan Winter², Rosana Blawid¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52-171.900, Recife, Pernambuco, Brazil, tathy-halora@hotmail.com, ariscom22@gmail.com, rosana.blawid@ufrpe.br

²Plant Virus Department, Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Inhoffenstrasse 7B, Braunschweig 38124, Germany, paolo.margaria@dsMZ.de, stephan.winter@dsMZ.de

³Department of Plant Pathology, Agronomy faculty, Universidad Nacional Agraria LaMolina, Perú, alejandrорisco@lamolina.edu.pe

Resumo

A melancia (*Citrullus lanatus*) é cultivada em países como China, Irã, Turquia e Brasil, sendo estes os maiores produtores da fruta a nível mundial. A cultura é afetada principalmente por vírus pertencentes aos gêneros *Potyvirus* e *Orthotospovirus*. Recentemente foi relatado o orthotospovírus da mancha anelar do amendoim (GRSV) na cultura da melancia no Brasil. O objetivo do presente trabalho foi o diagnóstico e a caracterização biológica e molecular do GRSV de campos produtivos de melancia nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará - Brasil. Um total de 129 amostras foliares com sintomas virais foi coletado entre 2020 e 2021, e os seguintes testes foram realizados: *Nitrocelulose imunoenzimática* (Dot - ELISA) e *Enzyme - Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) usando os anticorpos anti-GRSV (0781-DZMS, Alemanha), anti-potyvirus (0573/1-DSMZ) e anti-TSWV (0106/3-DSMZ). Oligonucleotídeos específicos foram desenhados e usados em ensaios de detecção por RT-PCR. Além disso, um estudo de gama de hospedeiros foi realizado, onde oito espécies de plantas foram escolhidas e analisadas em 10 repetições cada. No intuito de descobrir quais possíveis vírus estavam infectando as plantas de melancia, o sequenciamento de alto desempenho (HTS) foi realizado a partir de RNA total extraído de plantas infectadas de *Nicotiana benthamiana*. Com os *reads* resultantes do HTS, as sequências dos segmentos S (3039 nt), M (4857 nt) e L (8882 nt) de GRSV foram montados. O Blastn revelou que a sequência nucleotídica do segmento S, M e L de GRSV é 98,94%, 98,45%, 98,86% idêntica, respectivamente, com as sequências do isolado de GRSV do estado do Piauí no Brasil (Genbank MK503848, MK503850, MK503849). A análise de recombinação não indicou um sinal de recombinação com alta significância. As análises via ACP-ELISA realizadas com amostras da segunda coleta revelaram que de 12 das 26 amostras de melancia apresentavam infecção por GRSV e potyvírus, caracterizando a ocorrência de infecção mista. A análise por DAS-ELISA (anti-TSWV) revelou que 14 de 28 plantas foram positivas para TSWV. Além disso, plantas de melancia (Crimson sweet) (6), *N. benthamiana* (1) e *Nicandra physalodes* (1) foram positivas para GRSV por RT-PCR. Em relação à análise da gama de hospedeiros as espécies *N. benthamiana*; *N. physalodes*; *Capsicum annuum*; *Solanum lycopersicum*; *Physalis florida* e *Citrullus lanatus* testaram positivo para GRSV via Dot - ELISA. Em conclusão, os resultados mostram que o GRSV infecta os campos de melancia do Rio Grande do Norte e Ceará, e que a presença de infecção mista pode provavelmente contribuir para os sintomas observados no campo.

Palavras chaves: *Citrullus lanatus*; GRSV; Tospoviruses

Abstract

Watermelon (*Citrullus lanatus*) is mainly cultivated in China, Iran, Turkey and Brazil, which are worldwide the largest producers of the fruit. The crop is mainly affected by viral species belonging to the genus *Potyvirus* and *Orthotospovirus*. Recently, groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV) was reported in watermelon fields in Brazil. The main objective of this work was the diagnosis and biological and molecular characterization of GRSV from watermelon fields from the states of Rio Grande do Norte and Ceará - Brazil. For this purpose, a total of 129 plants showing viral symptoms was collected between the years of 2020 and 2021, and the following assays were performed by *Immunoenzymatic Nitrocellulose* (Dot - ELISA) and *Enzyme - Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) using anti-GRSV (0781-DZMS, Germany), anti-potyvirus (0573/1-DSMZ) and anti-TSWV (0106/3-DSMZ) antibodies. Specific oligonucleotides were designed and used for detection via RT-PCR. In addition, a host range study was carried out, in which eight plant species were chosen and analyzed in ten replicates each. To find out which possible viruses were infecting watermelon plants, High Throughput Sequencing (HTS) was performed using total RNA extracted from infected *Nicotiana benthamiana* plants. With the resulting *reads* from the HTS, the S (3039 nt), M (4857 nt) and L (8882 nt) sequences of GRSV were assembled. Blastn revealed 98.94%, 98.45%, 98.86% of identity with the S, M and L sequences of GRSV isolated from watermelon plants fields from the state of Piauí in Brazil (Genbank MK503848, MK503850, MK503849). Recombination analysis did not indicate a recombination signal with high significance. The ACP-ELISA assays performed with samples from the second collection revealed that 12 of the 26 watermelon samples had GRSV and potyvirus infections, characterizing the occurrence of mixed infection. DAS-ELISA (anti-TSWV) tests revealed that 14 of the 28 plants were positive for TSWV. Moreover, watermelon (*Crimson sweet*) (6), *N. benthamiana* (1) and *Nicandra physalodes* (1) plants were positive for GRSV by RT-PCR. Regarding the host range results, the species *N. benthamiana*; *N. physalodes*; *Capsicum annuum*; *Solanum lycopersicum*; *Physalis florida* e *Citrullus lanatus* were positive for GRSV via Dot - ELISA. Taken together, the results show that GRSV infects watermelon fields in Rio Grande do Norte and Ceará and that the presence of mixed viral infection may probably contribute to the symptoms observed in the field.

Keywords: *Citrullus lanatus*; GRSV; Tospoviruses

INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus* L.) está inserida na família Cucurbitaceae e tem como seu registro de origem a África Tropical (Chomicki et al. 2019; FAO 2020). Diferentes variedades e cultivares (forma comercial) desta planta podem ser encontradas (Chomicki e Renner 2014). A melancia é atualmente cultivada em regiões tropicais e subtropicais no mundo todo (Leonel et al. 2000), mas só foi introduzida no Brasil no século XVI, onde foi disseminada pela região Nordeste do país (Barbieri e Stumpf 2008, Romão 2000). Posteriormente houve uma segunda introdução de híbridos melhorados da espécie, advindos de países como Japão e Estados Unidos, no estado de São Paulo, estabelecendo-se, a partir destes, o cultivo comercial do fruto no Brasil (Barbieri e Stumpf 2008). A melancia possui frutos com diferentes formas, como por exemplo: arredondadas, ovais e cilíndricas (Hora et al. 2018) e varia o seu tamanho de pequeno a grande, podendo ser colhida de 65 a 100 dias após o plantio (Schaffer e Paris 2003), tendo uma importante participação socioeconômica no Brasil (Hora et al. 2018; Cavalcante et al. 2010). O cultivo é realizado tanto por pequenos produtores familiares, quanto por grandes produtores, onde a produção é destinada para o consumo interno e a exportação, além de empregar mão-de-obra rural gerando emprego e renda (Nunes et al. 2017). As produções renderam ao Brasil, no ano de 2018, a quarta posição, como um dos maiores produtores da fruta a nível mundial (FAO 2020).

A cultura da melancia é mundialmente acometida por problemas virais, entretanto, ao relacionar-se a problemática no Brasil, temos espécies de dois principais gêneros virais causadores de doenças: os *Potyvirus* e *Orthotospovirus*. No Brasil, nove espécies virais são relatadas causando doenças na cultura de melancia: *Groundnut ringspot orthotospovirus* (GRSV) (Leão et al. 2015), *Zucchini lethal chlorosis orthotospovirus* (ZLCV) (Rezende et al. 1997), *Squash mosaic virus* (SqMV) (Lima e Amaral 1985); *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Lima et al. 1997) e *Watermelon mosaic virus* (WMV) (Ávila et al. 1984), *Papaya ringspot virus - strain W* (PRSV-W) (Halfeld-Vieira et al. 2004; Lima et al. 2012) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Poltronieri et al. 2000) (Kitajima, 2020), *watermelon crinkle leaf-associated virus 1* e *watermelon crinkle leaf-associated virus 2* (Maeda et al. 2021). Lima et al. em 1997 realizaram a testagem de 269 amostras de melancias do submédio São Francisco para vírus, e detectaram PRSV-W (132), WMV (35) e CMV (5). Os autores também analisaram 341 amostras de melancia oriundas de oito estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, São Paulo) e o Distrito Federal, e os seguintes vírus PRSV-W (59), CMV (11), SqMV (4) ZLCV (122), ZYMV (25) e WMV (14) foram detectados. Neste estudo de Lima et al. (2017) o ZLCV foi considerado o principal causador de

doenças em melancia em Goiás e no Distrito Federal. No estado de Tocantins Aguiar et al. (2015) realizaram a coleta de amostras (752) de melancia com sintomas virais, na região de Gurupi, Lagoa da Confusão, Formoso do Araguaia e no Porto Nacional. As amostras coletadas foram testadas indicando a presença de PRSV-W (22%), WMV (15%), ZLCV (11%), CMV (5%) e ZYMV (4%). Além disso, também foi observado a presença de infecções mistas entre PRSV-W+WMV e, entre PRSV+ZLCV. Dos vírus encontrados, o PRSV-W foi o mais predominante, principalmente na região de Formoso do Araguaia.

Estima-se que, em um âmbito geral, os vírus de plantas podem causar uma perda econômica mundial de até 50 bilhões de euros por ano (Pallás et al. 2018). A interação vírus-planta contribui para problemas no desenvolvimento de seus hospedeiros e consequente perdas produtivas (Ullman 1991; Hull e Centre 2014; Medeiros et al. 2015). Conforme relatado por Singh e Krishnareddy (1996), o watermelon bud necrosis orthotospovirus levou a perdas produtivas de 100% de melancia na Índia. Aguiar et al. (2013) demonstraram uma redução de 100% no peso dos frutos em experimentos com plantas de melancia da variedade Crimson sweet infectadas com o CMV. Portanto, verificaram que a infecção viral pode tornar-se um fator limitante à produção da cultura. No Brasil, Lima et al. (1999) relataram que o PRSV-W provocou drásticas perdas na produção de melancia em áreas de perímetro irrigado de Petrolina e Juazeiro da Bahia, chegando a perdas de 100% da produção, especialmente quando a infecção ocorria na fase inicial de desenvolvimento das plantas. Tavares et al. (2017) também demonstram a predominância de ZYMV e SqMV (35%), em associações mistas, em áreas produtoras de melancia do Estado de Tocantins. No entanto, nos últimos anos, a cultura da melancia no Brasil vem sendo diagnosticada com infecções virais pela espécie GRSV. Leão et al. (2015) encontraram o GRSV em campos produtivos de melancia do Estado de São Paulo entre os anos de 2012 e 2013. O GRSV possui uma ampla gama de hospedeiros, podendo ser encontrado também causando infecções em plantas de alface (Gracia et al. 1999), amendoim (Camelo-García et al. 2014), tomate (Webster et al. 2010), pepino (Spadotti et al. 2014), dentre outros hospedeiros.

O GRSV está inserido dentro do gênero *Orthotospovirus*, família *Tospoviridae* (Abudurexiti et al. 2019). A partícula viral varia entre 80 a 120 nm de diâmetro, e é envelopada com projeções de glicoproteínas aderidas ao mesmo (Kormelink et al. 2021). O material genético é composto de fita simples de RNA de polaridade negativa, constituído de três segmentos: S (*small*), e M (*medium*) (ambos ambisense), que codificam duas proteínas cada e possuem uma região intergênica, rica em adenina (A) e uracila (U); e o segmento L (*large*) que codifica a proteína L (RNA-polimerase dependente de RNA) (Kormelink et al. 1993). As

espécies pertencentes a este gênero se enquadram nos critérios de demarcação, sendo eles: a relação sorológica da proteína N (capa proteica), a sequência de aminoácidos da proteína N ser menor que 90% de identidade, a gama de hospedeiros e a especificidade do vetor. A principal forma de transmissão dos orthotospovírus é pelo inseto vetor tripes (modo persistente propagativo) (Ávila et al. 1993; Zhao e Rosa 2020), entretanto, o mesmo também pode ser mecanicamente transmitido.

Os produtores de melancia dos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, em comunicação pessoal, relataram o aumento da ocorrência de problemas relacionados a vírus em campo, especialmente a partir do ano de 2018. Os problemas virais levaram a perda das áreas produtivas em até oitenta por cento, mediante a expressão de severos sintomas virais que inviabilizaram o desenvolvimento das plantas e consequentemente dos frutos ou diminuíram drasticamente a sua qualidade. Diante do crescimento de áreas produtoras de melancia e da importância econômica e social que a cultura representa, este estudo teve por objetivo diagnosticar e caracterizar as doenças virais associadas à melancia na região produtora do Rio Grande do Norte e Ceará. Para tanto, amostras foliares com sintomas virais foram coletadas e submetidas a testes sorológicos, sendo posteriormente inoculadas em plantas de *N. benthamiana* que foram secas e encaminhadas ao instituto DSMZ para o sequenciamento de última geração (HTS). Por fim, a caracterização biológica e molecular também foi realizada com intuito de no futuro sugerir medidas promissoras de controle viral na cultura da melancia.

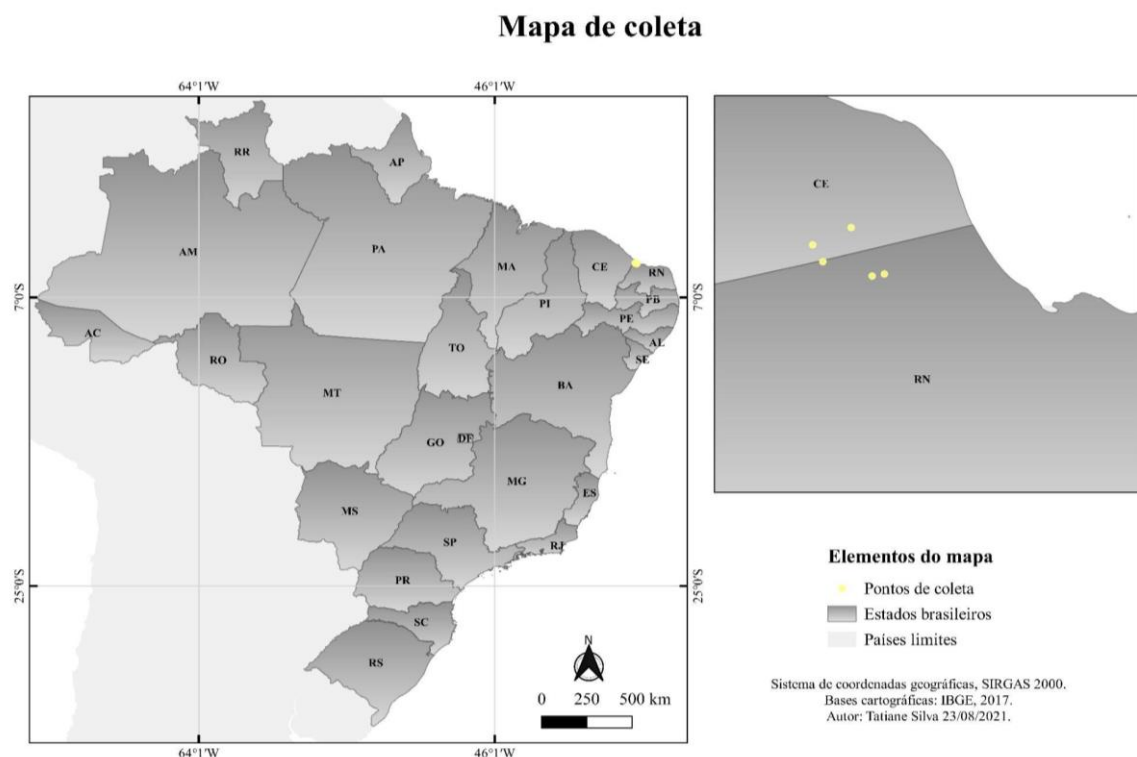
MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das plantas

Este trabalho foi desenvolvido com plantas de melancia cultivadas na região produtora do Estado do Rio Grande do Norte - Mossoró e Ceará. Para o desenvolvimento do trabalho foram realizadas duas coletas de folhas de melancia apresentando sintomas de mosaicos, necroses e deformações, indicando infecção por orthotospovírus. A coleta foi realizada ao final do ciclo da cultura de melancia, após a colheita dos frutos comerciais. Em janeiro de 2020 foram visitados quatro campos de melancia divididos entre as regiões de Cacimba funda (Mossoró), Cajazeiras e Mata Fresca (Ceará), e um total de 96 amostras foliares foram coletadas. Uma segunda coleta foi realizada em janeiro de 2021 (um dos campos de produção de Cacimba funda foi revisitado) de 33 amostras foliares apresentando sintomas virais. A Figura 1 mostra o mapa das áreas de coleta e a Tabela 1 as variedades com a correspondente quantidade e localização de coleta. As plantas foram escolhidas aleatoriamente com amostragem do tipo zigzag. As amostras foram embaladas em sacos de papel, identificadas, colocadas em isopores contendo

gelo artificial e, conduzidas ao laboratório de Fitovirologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Figura 1 - Amostras de melancia coletadas em 2020/2021 em campos do Rio Grande do Norte e Ceará.



Um total de 129 amostras de melancias apresentando sintomas virais foram coletadas, e são representadas por dez híbridos diferentes conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantificação de amostras e híbridos de plantas de melancia coletadas.

¹ Número de amostras	² híbridos	³ Localização
Primeira coleta (Jan, 2020)		
11 (CE) 12 (RN)	Troubadour	4°51'39.2"S, 37°27'54.8"W(CE) e 4°53'01.8"S 37°27'05.3"W (RN)
10 (CE) 10 (CE)	Durlinda	4°51'39.2"S, 37°27'54.8"W(CE) e 4°50'12.4"S, 37°24'51.6"W (CE)
11	Polimax	4°53'01.8"S, 37°27'05.3"W (RN)
7	Lola	4°53'59.1"S, 37°22'10.1"W (RN)
10	SP6	4°53'01.8"S, 37°27'05.3"W (RN)
6	Quetzali	4°53'01.8"S, 37°27'05.3"W(RN)
11	Traveler	4°53'01.8"S, 37°27'05.3"W (RN)
4	Shintosa Camelforce	4°54'09.6"S, 37°23'08.5"w (RN)
4	Premium	4°54'09.6"S, 37°23'08.5"w (RN)
1	Polimax	4°54'09.6"S, 37°23'08.5"w (RN)
96		

Segunda coleta (Jan, 2021)		
32	ACX 6177	4°53'01.8"S, 37°27'05.3"W (RN)
1	Durlinda	4°53'01.8"S, 37°27'05.3"W (RN)
33		
total: 129		

¹ Número de amostras coletas por híbrido

² Híbridos de *Citrullus lanatus* coletadas

³ Localização da coleta

Manutenção do vírus através de inoculação mecânica

Para a manutenção viral, material foliar apical de melancia sintomático foi mecanicamente inoculado em plantas de *N. benthamiana*. A inoculação mecânica foi realizada a partir do macerado de plantas sintomáticas em tampão fosfato (1 M KH_2PO_4 monobásico e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dibásico pH 7,4). Para tanto, pulverizou-se o abrasivo Celite 545 mesh (0,02-0,1 mm) nas folhas e por fricção realizou-se a inoculação com o macerado, deixando o extrato em repouso por 5 min nas folhas jovens (estádio de 2-4 folhas). O excesso de abrasivo foi retirado por lavagem com água de torneira.

Identificação sorológica do isolado

Para identificação sorológica utilizou-se folhas apicais e/ou locais sintomáticas que foram maceradas em microtubos da marca Eppendorf de 2 mL na proporção de 1:200 utilizando-se o tampão 1x PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,01 M Na_2HPO_4 , 0,018 M KH_2PO_4 , pH 7,4). As amostras foram testadas com o anticorpo policlonal anti-GRSV (AS-0781/DSMZ) em testes de Dot-ELISA (Hawkes et al. 1982) e ACP-ELISA (primeira e segunda coleta) e com o anticorpo anti-potyvirus (AS-0573/1/DSMZ) em testes de ACP-ELISA (primeira coleta). Os anticorpos foram produzidos e fornecidos pelo instituto Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - DSMZ, Alemanha. A primeira coleta de plantas também foi testada por DAS-ELISA para o tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV) com o sistema PathoScreen TSWV (Agdia, *One Anti-TSWV coated plate*). Os procedimentos para o teste DAS-ELISA foram realizados conforme o protocolo estabelecido pelo DSMZ, Alemanha. O restante do material foi conservado em congelador (- 20° C).

Conservação de material e sequenciamento Illumina

Cinco amostras de plantas sintomáticas de *N. benthamiana* inoculadas (27 dias após inoculação-dpi) foram coletadas e secas, inicialmente em sílica gel a 4° C por três dias. Após esse prazo, retirou-se o material seco da sílica gel e transferiu-se para um tubo falcon de 15 mL contendo cloreto de cálcio e algodão (para separar o produto químico da amostra) na base. Essas amostras foram etiquetadas e processadas por pesquisadores do instituto DSMZ para extração de RNA total, e sequenciamento de alto rendimento (HTS) através da tecnologia da plataforma Illumina Nextera (1-2 Gb, 2 x 301 bp). O processo de secagem a 4° C também foi realizado com as amostras foliares que foram coletadas em janeiro de 2021.

Extração de RNA total e RT-PCR

Sete plantas Durlinda (1) e ACX 6177 (6) foram escolhidas e tiveram seu RNA total extraído com o kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA,) de acordo com o protocolo do fabricante (<https://www.qiagen.com/us/>). O RNA total das espécies *N. benthamiana* e *Nicandra physalodes* também foi extraído. A partir do RNA total extraído foram realizados testes de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) com os seguintes conjuntos de *primers* especificamente desenhados para a detecção genômica do GRSV: Tospo N (forward, 5'-GAGCAATTGTGTCAATTTTATTC-3' e reverse, 5'-AACACACTTAGTATTATGCATCT-3'). Para validação (via sequenciamento Sanger) dos dados obtidos através do HTS, os seguintes *primers* foram desenhados a partir da sequência genômica montada de GRSV (658-forward, 5'-ACACTAAAGAAGCTCTGGGGAAG-3' e 2723-reverse, 5'-TTGCATGCATCCCGAATCATAAC-3'); UHP (Cortez et al. 2001); GRSV1 (forward, 5'-CAGTTCTTGCAACCCCAACG-3' e reverse, 5'-GCTTGTCAGCAAACATGCAGA-3'); GRSV2 (forward, 5'-ATGGGAGCAGATTGAGGGGA-3' e reverse, 5'-CAGCCCTGAACTAACCCCAG-3'). Dois sistemas foram utilizados para a realização da RT-PCR. O primeiro utilizando o kit *SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Waltham, EUA), onde os parâmetros variaram de acordo com o protocolo do fabricante (<https://tools.thermofisher.com/>). Para a realização da RT-PCR de detecção os seguintes parâmetros foram utilizados: 50° C por 30 minutos, 94° C – 2 min, 35 ciclos com 94 ° C – 30 s; 58° C – 1 min; 72° C – 1 min e para extensão final 72° C – 10 min. Para a RT-PCR de confirmação da região intergênica um segundo sistema foi utilizado. O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit *SuperScript IV First – Strand cDNA Synthesis Reaction kit* (Invitrogen, Waltham, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (<https://www.thermofisher.com/br>), e amplificação do cDNA e a PCR foi realizada utilizando o kit *Thermo Scientific Phusion High-*

Fidelity PCR Master Mix, de acordo com as instruções do fabricante (<https://www.thermofisher.com/br>). Os seguintes parâmetros foram utilizados: 80° C por 1 minuto (*hot start* manual), 98° C – 3 min, 35 ciclos com 98 ° C – 30 s; 58° C – 30 s; 72° C – 2 min e extensão final de 72° C – 10 min. O produto da RT-PCR foi purificado com a utilização do kit *Wizard sv gel and PCR clean-up system* (Promega, Madison, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante (<https://www.promega.com.br/>), e posteriormente sequenciados por Sanger pelo Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Montagem do genoma de GRSV

A análise de bioinformática seguiu-se com a adaptação do pipeline proposto por Blawid et al. (2017). Primeiramente, as análises de qualidades foram realizadas a partir da biblioteca de sequenciamento HTS (*forward* e *reverse*). Em seguida as bibliotecas foram avaliadas taxonomicamente através do software Kaiju (Menzel et al. 2016). A análise de qualidade dos *reads* obtidos com o sequenciamento foi realizada através do programa FastQC v.0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Os *reads* de baixa qualidade (PHRED<20), assim como resto de adaptadores foram trimados com a utilização do software Trimmomatic v.0.39 (Bolger et al. 2014), através dos seguintes parâmetros: LEADING 20; TRAILING 20; SLIDINGWINDOW 4:20; MINLEN 36. Após a trimagem os *reads* foram analisados novamente no programa FastQC v.0.11.9. Os dados trimados foram montados com o software SPAdes v.3.12.0 (k-mers: 21,33,77), obtendo-se os *contigs*. Os programas FastQC v.0.11.9, Trimmomatic v.0.39 e SPAdes v.3.12.0 foram utilizados pela plataforma on-line Galaxy (<https://usegalaxy.org/>).

Os *contigs* foram transferidos ao software Geneious v. 11.0.5 (Biomatters, Auckland, New Zealand) (Biomatters 2018) para realização da análise tBLASTX utilizando um banco de Refseq viral construído manualmente (março, 2020). Em seguida os *contigs* que alinharam com as sequências de GRSV foram separados de acordo com seus respectivos segmentos (S, M e L) e a estratégia de montagem *de novo* foi utilizada para obtenção dos fragmentos genômicos. O maior *contig* em tamanho foi utilizado para mapeamentos/extensão (*reads* contra *contigs*) até a montagem completa dos segmentos virais. Inicialmente, uma caracterização dos segmentos montados, as regiões codantes, foram analisadas por comparação com BLASTn e BLASTp através do site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. A caracterização genômica das sequências dos segmentos virais foi realizada com software SDT (*Sequence Demarcation Tool*) versão 1.2 (Muhire et al. 2014). Os putativos pesos moleculares foram calculados através do

site https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html. Para observação dos domínios conservados presentes em proteínas virais dos orthotospovírus o site *Conserved Domain Database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) foi utilizado.

Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada com a sequência completa de nucleotídeos do gene que codifica a proteína N (usada para a demarcação a nível de espécie). A descrição da sequência do isolado de GRSV_RN montado e das sequências de isolados de orthotospovírus disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, GenBank – Banco de dados de sequenciamento de genomas) estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Conjunto de dados de sequências dos genes N usados para as análises filogenéticas.

BANCO DE DADOS				
¹ Identificação	² Vírus/ Acrônimos	³ Países	⁴ Hospedeiro	⁵ Gene (nt)
KU179515_TSWV_USA_OB_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	Estados Unidos da America (USA)	Manjeriçao (OB)	777
KP008131_TSWV_ES_SL_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	Espanha (ES)	Tomate (SL)	777
MG602673_TSWV_ZW_CH_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	Zimbabué (ZW)	Crisântemo (CH)	777
MG025804_TSWV_AT_PE_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	Australia (AT)	Pimentão (PE)	777
KY250490_TSWV_SA_SL_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	Sul da África (SA)	Tomate (SL)	777
JF960235_TSWV_CN_SL_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	China (CH)	Tomate (SL)	777
MN365037_TSWV_CN_AH_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	China (CH)	Amendoim (AH)	777
MG983521_TSWV_IT_PE_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	Itália (IT)	Pimenta (PE)	777
KM365066_TSWV_AT_SL_N	tomato spotted wilt orthospovirus (TSWV)	Australia (AT)	Tomate (SL)	777
GRSV_S_BR_CL_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	Brasil (BR)	Melancia (CL)	777
MK503848_GRSV_BR_CL_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	Brasil (BR)	Melancia (CL)	777
HQ644140_GRSV_TCSV_USA_SL_N	groundnut ringspot orthospovirus (L _G M _T S _G)	Estados Unidos da América (USA)	Tomate (SL)	777
KY400110_GRSV_BR_AH_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	Brasil (BR)	Amendoim (AH)	777
MH686229_GRSV_BR_GM_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	Brasil (BR)	Soja (GM)	777
MG797643_GRSV_BR_TH_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	Brasil (BR)	Thrips (TH)	777

Continuação da Tabela 2

MN364668_GRSV_BR_CL_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	Brasil (BR)	Melancia (CL)	777
MT423642_GRSV_AR_AH_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	Argentina (AR)	Amendoim (AH)	777
MT423644_GRSV_AR_AH_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	Argentina (AR)	Amendoim (AH)	777
MH742958_GRSV_SA_AH_N	groundnut ringspot orthospovirus (GRSV)	África do Sul (SA)	Amendoim (AH)	777
KX463274_TCSV_DR_PE_N	Tomato chlorotic spot orthospovirus (TCSV)	República dominicana (DR)	Pimenta (PE)	777
MH427863_TCSV_HT_AH_N	Tomato chlorotic spot orthospovirus (TCSV)	Haiti (HT)	Amendoim (AH)	777
MH742961_TCSV_BR_SL_N	Tomato chlorotic spot orthospovirus (TCSV)	Brasil (BR)	Tomate (SL)	777

A Tabela 2 mostra como as sequências foram rotuladas na ordem: Código organizado no acrônimo: número de acesso do GenBank, espécie viral, país encontrado, hospedeiro e gene. Em negrito está destacado o isolado de GRSV montado durante a análise deste trabalho.

¹ Identificação das sequências utilizadas

² Nome do vírus e como foi identificado

³ País do isolado e como foi identificado

⁴ Hospedeiro do isolado e como foi identificado

⁵ Gene de trabalho

A árvore filogenética foi inferida com sequências de nucleotídeos, alinhadas, do gene N (777 nt) de GRSV, TCSV e TSWV, através dos programas MEGAX (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Kumar et al. 2018) e jModelTest v.2.1.10 (permite encontrar o melhor modelo de substituição) (Darriba e Posada 2016). O melhor modelo de substituição foi utilizado no programa MrBayes v3.2.7 (Ronquist et al. 2011) para inferência bayesiana utilizando os seguintes parâmetros: lset nst=2 (modelo HKY) rates=gamma; mcmc ngen=10000000 samplefreq=1000; sumt burnin=1000000). A visualização da árvore gerada foi realizada com o programa FigTree v1.4.4 (Rambaut 2010). Para verificação de pontuações de identidade de pares (a nível de aminoácidos e nucleotídeos) dos genes N, NSs (Segmento S); NSm, GP (Segmento M) e L (segmento L), foram utilizadas as sequências de isolados de GRSV já descritos e dispostos no Genbank, as sequências de TCSV e TSWV e a sequência montada de GRSV_RN. Para essa análise foi utilizado o programa *Sequence Demarcation Tool* versão 1.2 (SDTv 1.2) (Muhire et al. 2014). Os números de acessos das sequências dos isolados virais utilizados nas análises estão a seguir: GRSV ‘PI’ (MK503848, MK503849, MK503850); GRSV ‘GRSV-W-TO_S’ (MN364668, MN364669, MN364670); GRSV ‘DSMZ PV-0205’ (MT723993, MT723992, MT723991); GRSV ‘SA-05’ (MH742958, MH742957, MH742956); GRSV ‘AR’ (KT972594, KT972593, KT972592, KT972591, KT972590); GRSV ‘GRAR-S’ (KY400110, KY350137, KY350136); GRSV ‘LEM’ (MH686229, MH686227, MH686228); GRSV ‘LgMtSg’ (HQ644140, HQ644141, HQ644142); GRSV ‘Villa_Reduccion_A’ (MT423640), GRSV ‘Malena’ (MT423644); GRSV ‘Hernando’ (MT423629); GRSV ‘Pampayasta_B’ (MT423628); GRSV ‘General_Deheza_D’ (MT423635); GRSV ‘Gigena’ (MT423636); GRSV ‘Santa_Eufemia’ (MT423645); GRSV ‘El Crispin’ (MT423642); GRSV ‘General_Deheza_A’ (MT423630); GRSV ‘General_Deheza_C’ (MT423633); GRSV ‘Villa_ascasubi’ (MT423646); GRSV ‘General_Fotheringham’ (MT423643); GRSV ‘Rio_Cuarto_A’ (MT423631); GRSV ‘Rio_Cuarto_B’ (MT423638); GRSV ‘Beneral_Deheza_B’ (MT423632); GRSV ‘Manfredi_B’ (MT423634); GRSV ‘Dalmacio_Velez’ (MT423639); GRSV-BR (AF213673). TCSV ‘DR’ (KX463274, KX463273, KX463272); TCSV (AY574054); TCSV ‘Haiti’ (MH427863, MH427862, MH427861); TCSV ‘BR-03’ (MH742961, MH742960, MH742959). TSWV ‘Mum-A5’ (MG602673, MG602672, MG602671); TSWV ‘LK-1’ (KY250490, KY250489, KY250488); TSWV ‘PA01’ (KT160282, KT160281, KT160280); TSWV ‘WA7’ (KM365066, KM365065, KM365064); TSWV ‘YNHS’ (MN365037, MN365035, MN365036); TSWV ‘LE’

(KU976396, KU976395, KU976394); TSWV ‘Pepper2 CY-CN’ (HM581942, HM581941, HM581940); TSWV ‘YN’ (JF960235, JF960236, JF960237); TSWV ‘MT723987’ (MT723987, MT723986, MT723985).

A análise de recombinação foi realizada com o programa RDP v.4. 100 (*Recombination Detection Program*) (Martin et al. 2015) utilizando os algoritmos BOOTSCAN, CHIMAERA, GENECONV, MAXCHI, RDP, SISCAN e 3SEQ. Para tanto, um conjunto de dados composto de sequências dos genes N, NSs; GP, NSm e L, concatenados dos vírus GRSV, TCSV e TSWV foram utilizados nas análises, incluindo as sequências dos genes de GRSV_RN montado. Os acessos utilizados nas análises pelo RDP constam descritos na Tabela 3. As análises seguiram a configuração padrão, onde o maior valor de P aceitável foi de 0,05, e apenas eventos detectáveis por dois ou mais métodos foram considerados.

Tabela 3 - Descrição de dados das sequências utilizadas em análises de recombinação com o programa RDP.

¹ Identificação	Número de acesso dos segmentos virais		
	² S (N e NSs)	³ M (GP e NSm)	⁴ L (L)
GRSV_TCSV_USA_S. lycopersicum	HQ644140	HQ644141	HQ644142
GRSV_SA_A. hypogaea	MH742958	MH742957	MH742956
GRSV_BR_C. lanatus	MN364668	MN364669	MN364669
GRSV_RN_C. lanatus	GRSV_RN_S	GRSV_RN_M	GRSV_RN_L
TCSV_BR_S. lycopersicum	MH742961	MH742960	MH742959
TCSV_HT_A. hypogaea	MH427863	MH427862	MH427861
TCSV_DR_C. frutescens	KX463274	KX463273	KX463272
TSWV_AT_S. lycopersicum	KM365066	KM365065	KM365064

Solanum lycopersicum (S. lycopersicum); *Capsicum frutescens* (C. frutescens); *Citrullus lanatus* (C. lanatus); *Arachis hypogaea* L. (A. hypogaea). Estados Unidos da America (USA); África do sul (SA); BR (Brasil); Rio Grande do Norte (RN); HT (Haiti); República Dominicana (DR); Austrália (AT); groundnut ringspot orthotospovirus (GRSV); tomato chlorotic spot orthotospovirus (TCSV); tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV).

¹ Identificação de como foi utilizada na análise

^{2 3 4} Acessos utilizados nas análises de recombinação

Estudo da gama de hospedeiros

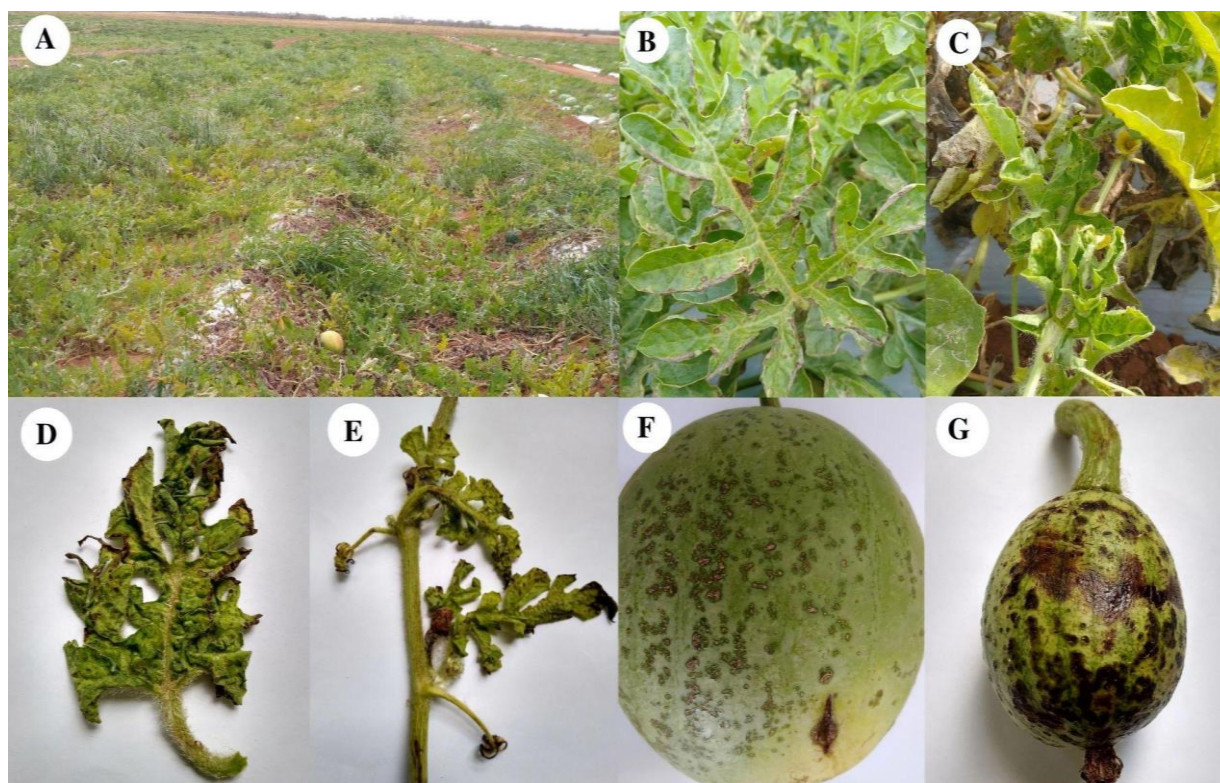
Para análise de gama de hospedeiros plantas de *N. benthamiana* previamente inoculadas (12 dpi) mecanicamente com o isolado de GRSV_RN de melancia (positivas em Dot-ELISA e RT-PCR) foram utilizadas como fonte de inóculo para a transmissão mecânica. As seguintes espécies de plantas foram utilizadas para o experimento: *Nicandra physalodes*, *Physalis florida*, Pimenta (*Capsicum baccatum* var. Dedo de Moça), Pimentão (*Capsicum annuum* var. Yolo Wonder), Tomate (*Solanum lycopersicum* var. Santa Clara e var. Santa Cruz) - Solanaceae. Melancia (*Citrullus lanatus* var. Crimson Sweet, var. Charleston Gray e var. Congo), Maxixe (*Cucumis anguria* var. Maxixe Caipira do Norte) e Pepino (*Cucumis sativus* var. Cucumber Caipiras) - Cucurbitaceae. Foram infectadas dez plantas de cada espécie.

RESULTADOS

Sintomas observados nos campos de melancia

Os sintomas encontrados nos campos de melancia foram semelhantes em ambas as coletas. Foi possível observar sintomas de amarelecimento com pontuações necróticas iniciais, bem como sintomas acentuados de necrose em folhas, haste e frutos de melancia. Os sintomas observados em campos estão exemplificados na Figura 2.

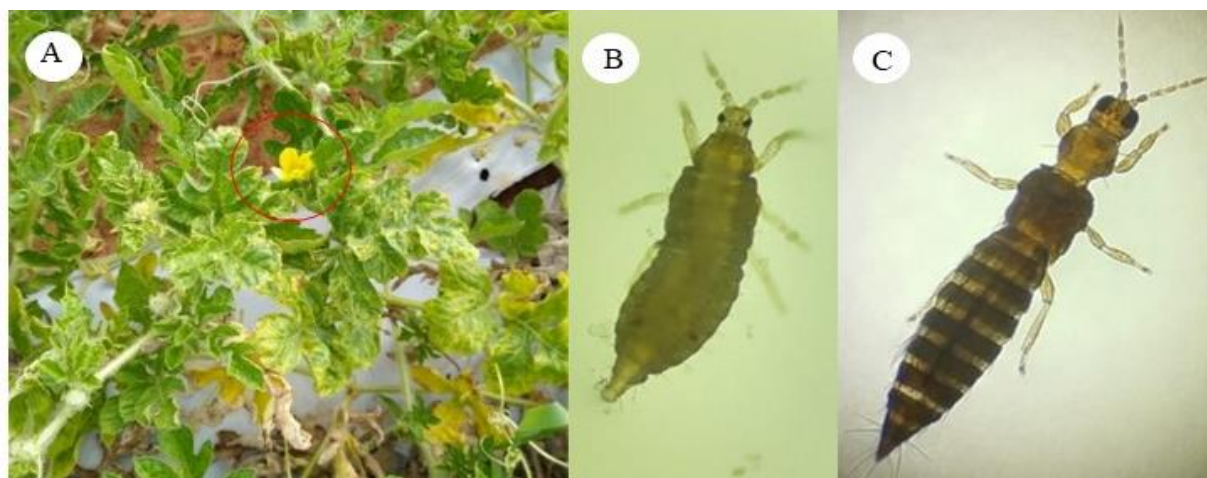
Figura 2 - Plantas e frutos de melancia com sintomas necróticos coletados nos campos do Rio Grande do Norte.



Campo de melancia com híbridos ACX 6177 (A); necrose em folhas de melancia da variedade Premium (B) Pontuações necróticas em folhas de melancia variedade C. sweet (C); necrose em folhas de melancia variedade Premium (D); folhas e caules de melancia com sintomas necróticos variedade Shintosa Camelforce (E); Necrose severa em frutos de melancia Shintosa Camelforce (G) e pontuações necróticas em frutos de melancia Shintosa Camelforce (G) e necrose severa em frutos de melancia Shintosa Camelforce (F).

Além dos sintomas nas plantas, também foi possível observar a presença de insetos vetores da ordem Thysanoptera nos campos de produção, uma vez que a coleta foi realizada no período seco do estado, fator que favorece o aumento da incidência dos mesmos, como demonstrado por Lowry et al. 1992. Os indivíduos coletados de flores de melancia foram fotografados, porém não foram identificados a nível de espécie, mas puderam ser identificados a nível de gênero, como *Frankliniella* sp. (comunicação pessoal com o Dr. Adriano Cavalleri, Universidade Federal do Rio Grande - RS), como descrito na Figura 3.

Figura 3 - *Frankliniella* sp. possível vetor de GRSV coletado em planta de melancia com sintomas virais.



Plantas sintomáticas coletadas (A). pré-pupa (B) e *Frankliniella* sp. adulto (C). Campo do Rio Grande do Norte, 2021.

Análise sorológica e molecular

O número de amostras cuja as reações foram positivas a GRSV, potyvirus e TSWV estão resumidas na Tabela 4. Os testes sorológicos de Dot-ELISA, ACP-ELISA e DAS-ELISA com plantas de melancia com sintomas sistêmicos foram utilizados nas análises.

Tabela 4 - Análise sorológica para identificação de GRSV (Dot-ELISA, ACP-ELISA, RT-PCR), potyvirus (ACP-ELISA) e TSWV (DAS-ELISA).

	² (+)	³ (+)	³ (+)	³ (+)	⁴ (+)
¹ Híbridos	Dot-ELISA GRSV	ACP-ELISA GRSV	ACP-ELISA Potyvirus	DAS-ELISA TSWV	RT-PCR GRSV
Primeira coleta					
Troubadour	0 23	nt	nt	0 4	nt
Durlinda	1 20	nt	nt	0 3	nt
Polimax	4 11	nt	nt	0 3	nt
LOLA F1	0 7	nt	nt	3 3	nt
SP-6	3 10	nt	nt	1 3	nt
Quetzali	0 6	nt	nt	3 3	nt
Traveler	0 11	nt	nt	1 3	nt
Shintosa Camelforce	0 4	nt	nt	3 3	nt

Premium	2 4	nt	nt	3 3	nt
10/96			14/28		
Segunda coleta					
Durlinda	1 1	1 1	1 1	nt	1 1
ACX-6177					
(Crimson sweet)	9 32	11 25	12 25	nt	5 6
10 33		12 26	13 26	6 7	
Total de amostras	20 129				

(+): Positivo; (nt): Não testado; GRSV: groundnut ringspot orthotospovirus; TSWV: tomato spotted wilt orthotospovirus.

¹ Híbridos utilizadas na análise

² Resultados referente aos testes de Dot-ELISA

³ Resultados referentes aos testes de ELISA

⁴ Resultados referentes aos ensaios com RT-PCR

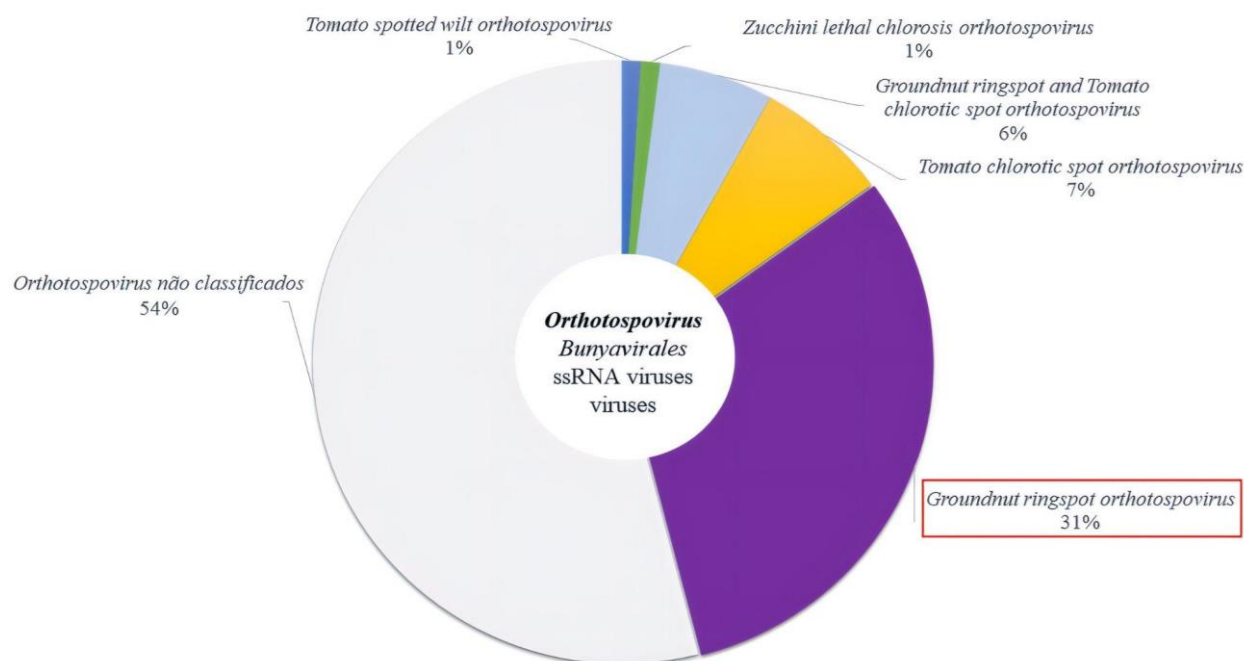
Os resultados referentes à primeira e segunda coleta mostraram que 20 plantas, de um total de 129 testadas por Dot-ELISA, foram positivo para a infecção por GRSV, sendo elas, Durlinda (1), Polimax (4), Sp-6 (3), Premium (2), Durlinda (1), e ACX-6177 (9), equivalente a 15% de infecção na amostra. Além disso, 28 amostras de melancia (primeira coleta) foram escolhidas e submetidas ao teste de DAS-ELISA (anti-TSWV), das quais 14 amostras testaram positivo, equivalente a 50% das amostras testadas. Das 33 plantas advindas da segunda coleta, 26 amostras foram analisadas pelo teste de ACP-ELISA com os anticorpos anti-GRSV e anti-potyvirus. Como resultado, 12 plantas foram positivas para o GRSV, correspondendo a 46,1% das amostras testadas e 13 para a presença de potyvirus (50% das plantas testadas). Portanto, de acordo com os resultados de ACP-ELISA referentes à segunda coleta, existe infecção mista de GRSV e potyvirus nas plantas de melancia, uma vez que as plantas positivas para GRSV também foram positivas para os potyvirus. Sete amostras foliares da segunda coleta de melancia tiveram o RNA total extraído e a infecção por GRSV foi confirmada pela RT-PCR.

Análise de bioinformática

O sequenciamento gerou uma biblioteca (*forward* e *reverse*) de *reads* com sequências que variaram de 35-301 nt de comprimento. A Figura 4 mostra o resultado da análise

taxonômica realizada na plataforma online Kaiju. A análise indicou a presença de sequências virais na biblioteca, sendo que 31% corresponderam a sequências da espécie *Groundnut ringspot orthotospovirus*.

Figura 4 - Análises metagenômicas da biblioteca HTS.



Trimagem dos reads e adaptadores

A análise de qualidade mostrou que 904.645,00 reads foram obtidos do HTS. No entanto, com a retirada das sequências de baixa qualidade (PHRED<20), assim como, de restos de adaptadores provenientes do sequenciamento, um total de 808.908,00 reads (95.737,00 reads foram trimados) foram usados para montagem dos contigs.

Montagem de contigs e análise de tBLASTX

O software SPAdes montou um total de 12.244 contigs que foram posteriormente submetidos a uma análise de tBLASTX com o programa Geneious v. 11.0.5. Após a análise de tBLASTX, um total de 215 contigs foi obtido referente a sequências de GRSV: 141 contigs correspondentes ao segmento S, 47 contigs ao segmento M e 25 contigs ao segmento L de GRSV, conforme descrito na Tabela 5.

Montagem “De novo” de genomas virais e caracterização molecular

O conjunto de contigs gerados de cada segmento foi submetido à estratégia de montagem *De novo*. Foram utilizados 14 contigs para a montagem do segmento S de GRSV, 9

contigs para o segmento M e 5 *contigs* para o segmento L. Após a montagem, o *contig* de maior tamanho em cada respectivo segmento (S, M e L) foi escolhido e estendido até a montagem completa dos segmentos virais.

Tabela 5 - Dados obtidos de acordo com a utilização dos softwares Trimmomatic v.0.39 e Geneious 11.0.5.

¹ <i>reads</i> HTS trimados	² Segmentos	³ tBLASTX (número de <i>contigs</i>)	⁴ <i>De novo</i> assembly (número de <i>contigs</i>)	⁵ <i>reads</i> (montagem)	⁶ cobertura (montagem)
F: 808908	S	141	14	146133	10709
R: 808908	M	47	9	167127	9313
	L	25	5	106396	4730

¹ F. biblioteca *forward*; R: biblioteca *reverse*, após a trimagem

² Segmentos do GRSV

³ Número total de *contigs* gerados com tBLASTX com similaridade a GRSV para cada segmento

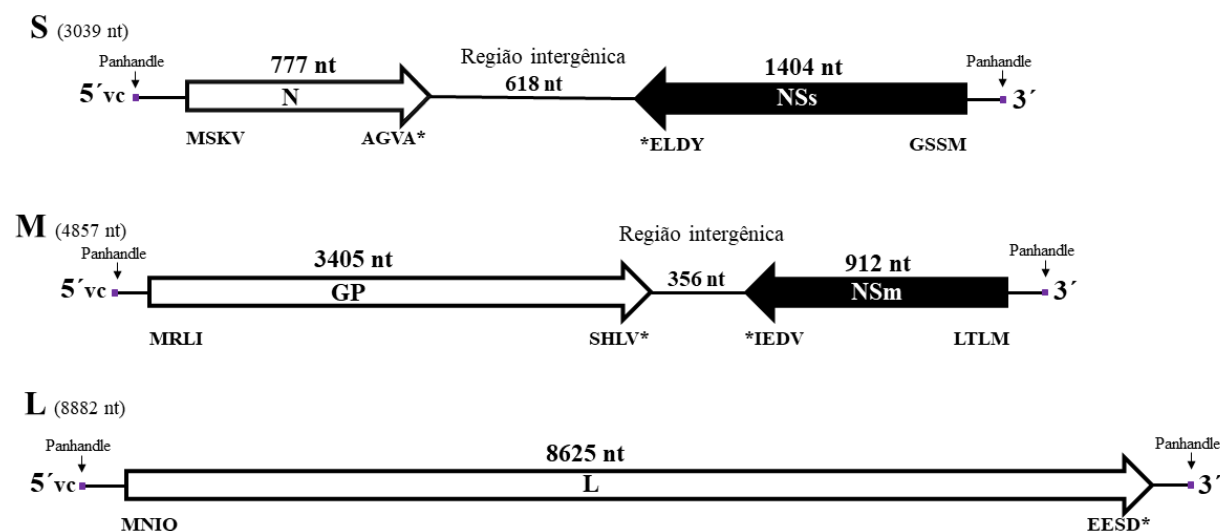
⁴ Número total de *contigs* gerados com a estratégia *De novo* de acordo com segmento viral

⁵ Total de reads na montagem

⁶ Cobertura total

O segmento S montado de GRSV é constituído por 3039 nucleotídeos (nt), onde 777 nt são respectivos a ORF que codifica para a proteína N (258 aa, 28.67 kDa) iniciado pelo códon ATG e finalizado pelo códon de parada TAA; 618 nt são referentes a uma região intergênica, e 1404 nt respectivos a ORF NSs que codifica a proteína NSs (468 aa, 52.65 kDa), com os mesmos códons iniciadores e finalizadores, além das regiões 5' UTR com 153 nt (localizada a estrutura *panhandle* - AGAGCAAT, cabo de panela) e 3'UTR (montada com 87 nt). Já o segmento M possui um comprimento total de 4857 nt. Este segmento também possui duas ORFs: uma ORF de 3405 nt que codifica a glicoproteína GP (1135 aa, 127.55 kDa), uma região intergênica de 356 nt e uma segunda ORF, que codifica a proteína NSm de 912 nt (304 aa, 33.84 kDa). Os códons de iniciação das proteínas são ATG e de parada TAA. As 5' (84 nt) e 3' (92 nt) UTRs do segmento M também foram montadas parcialmente. O segmento L é constituído de 8882 nt e possui uma ORF que codifica a proteína L (8625 nt, 2875 aa, 329.97 kDa) e possui o códon de iniciação ATG e de parada TAA. A 5' UTR (34 nt) e a 3'UTR (223 nt) foram montadas integralmente. A ilustração dos segmentos S, M e L (viral complementar - vc, sentido 5'-3') é demonstrada na Figura 5.

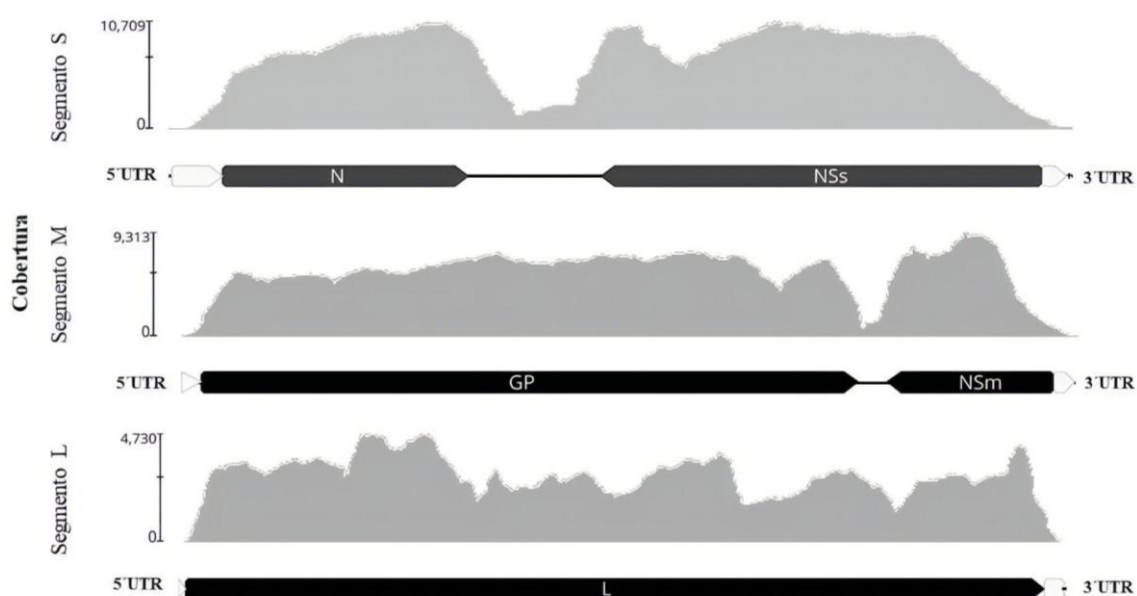
Figura 5 - Estrutura genômica dos segmentos S, M e L segmentos montados.



As setas escuras representam as ORFs que codificam proteínas da fita viral, e as demais setas (claras) representam as ORFs que codificam proteínas da fita viral complementar.

A imagem acima representa os três segmentos montados para o isolado de GRSV do Rio Grande do Norte. A Figura 6 mostra o gráfico de cobertura total obtido pelo HTS dos segmentos virais do GRSV_RN montado.

Figura 6 - Representação gráfica da cobertura (em nucleotídeos) dos segmentos S, M e L GRSV do Rio Grande do Norte - Mossoró.



Representação gráfica da cobertura dos segmentos viral complementar de GRSV. A barra vertical representa o número total de *reads* utilizados na montagem. As setas escuras

representam as regiões codantes e as setas claras nas extremidades representam as regiões UTR 5' e 3', respectivamente.

As análises de identidade comparadas dos genes N, NSs, GP, NSm e L obtidas através do BLASTn (nucleotídeo) e BLASTp (aminoácido) indicaram similaridades de sequência superiores a 95% com sequências de diferentes isolados de GRSV, ou seja, relativamente alta identidade, conforme demonstrado na Tabela 6. As análises também mostram que as sequências gênicas analisadas compartilham maiores identidades tanto a nível de nucleotídeo quanto de aminoácido com a sequência do isolado de GRSV de melancia identificado no Piauí 'GRSV-BR-PI', com exceção do gene NSs, que, a nível de nucleotídeo compartilhou maior similaridade com a sequência do isolado de GRSV da soja 'S4' isolado do Brasil. A nível de aminoácido a sequência NSs mostrou maior identidade com a sequência do isolado de GRSV 'L_GM_TS_G' (Webster et al. 2011), que é um genoma que sofreu rearranjo de GRSV com TCSV encontrado em plantações de tomate na Flórida.

Tabela 6 - Perfil de identidade dos genes N, NSs, GP, NSm e L. do GRSV do Rio grande do Norte (GRSV_RN).

Perfil de identidade dos genes do GRSV_RN		
	² BLASTn (nt)	³ BLASTp (aa)
¹ Genes	Id% Acesso	Id% Acesso
N	98.8 MK503848 - 'GRSV-BR-PI'	99.6 QE146322 - GRSV
NSs	95.13 MH388799 - GRSV	97.22 YP_004421856 - GRSV
GP	98.71 MK503850 - GRSV	99.03 QE146325 - GRSV
NSm	98.25 MK503850 - GRSV	100.0 QE146324 - GRSV
L	98.85 MK503849 - GRSV	99.58 QE146323 - GRSV

¹ genes do GRSV

^{2 3} Id%: porcentagem de identidade

Além disso, com a sequência nucleotídica dos segmentos S, M e L do isolado de GRSV_RN foi possível identificar as famílias de domínios conservados das proteínas virais do genoma montado. Portanto, sete famílias de domínio conservado foram localizadas, já previstas para o gênero *Orthotopovirus*. Do segmento S foram identificados o domínio da super família

Tospo_nucleocap (acesso cl03251, E-value: 1.63e-125) que codifica a proteína N (Ávila et al. 1993) e a Bunya_NS-S_2 (acesso pfam03231, E-value: 1.69e-168), responsável pelos blocos de construção da via de silenciamento de genes (Bucher et al. 2002). No segmento M foram identificados motivos pertencentes a família de domínio Bunya_G1 *super family* (acesso cl04155, E-value: 1.69e-168) (Pekosz e Gonzales-Scarano 1996) e 3A *super family* (acesso cl02970, E-value: 1.16e-50) correlacionada com as proteínas de movimento célula-a-célula de orthotospovírus e *coating protein* de potyvírus (Canto et al. 1997). No segmento L foram identificados os domínios Bunya_RdRp *super family* (acesso cl20265, E-value: 0e+00) presente em membros da ordem *Bunyavirales* (Chen et al. 2021); o domínio PDDEXK_nuclease-like *super family* (acesso cl40440, E-value: 1.25e-03) ou endonuclease de restrição (Knizewski et al. 2007), e o domínio do cytochrome_P450 *super family* (acesso cd20647, E-value: 3.76e-03) (Lamb et al. 2009). As super famílias estão resumidas na Tabela 7.

Tabela 7 - Regiões de domínio conservado.

¹ NOME	² TIPO	GRSV_RN		
		³ Posição inicial (nt)	⁴ Posição Final (nt)	⁵ Comprimento (nt)
Segmento S (vc)		1	3039	3039
5'-UTR	5'-UTR	1	153	153
Panhandle	Terminal conservado	1	8	8
N	CDS	154	930	777
Domínio: Tospo_nucleocap ₅₂	Domínio	154	891	738
Região intergênica	IR	931	1548	618
NSs	CDS	2952	1549	1404
Domínio: Bunya_NS-S_2 ₃₀	Domínio	2952	1654	1299
Panhandle	Terminal conservado	3032	3039	8
3'-UTR	3'-UTR	2953	3039	87
Segmento M (vc)		1	4857	4857
5'-UTR	5'-UTR	1	84	84
Panhandle	Terminal conservado	1	8	8
GP	CDS	85	3489	3404
Domínio: Bunya_G1 super family ₆₅₃	Domínio	1957	3048	1092
Região intergênica	IR	3490	3846	356
NSm	CDS	4,757	3,846	912
Domínio: 3A super family ₇₀	Domínio	4652	3939	713
Panhandle	Terminal conservado	4850	4857	8
3'-UTR	3'-UTR	4758	4849	92
Segmento L (vc)		1	8882	8882
5'-UTR	5'-UTR	1	34	34
Panhandle	Terminal conservado	1	8	8
L	CDS	35	8659	8625
Domínio: PDDEXK_nuclease-like super family ₁₁₂	Domínio	335	682	348
Domínio: Bunya_RdRp super family ₈₃₈	Domínio	2513	5044	2532
Domínio: cytochrome_P450 super family ₂₇₀₀	Domínio	8271	8103	169

Panhandle	Terminal	8882	8875	8
3'-UTR	3'-UTR	8660	8882	223

vc - viral complementar.

¹ Sequência analisada

² Tipo de sequência analisada

³ Posição de localização (nucleotídeo) inicial

⁴ Posição de localização (nucleotídeo) final

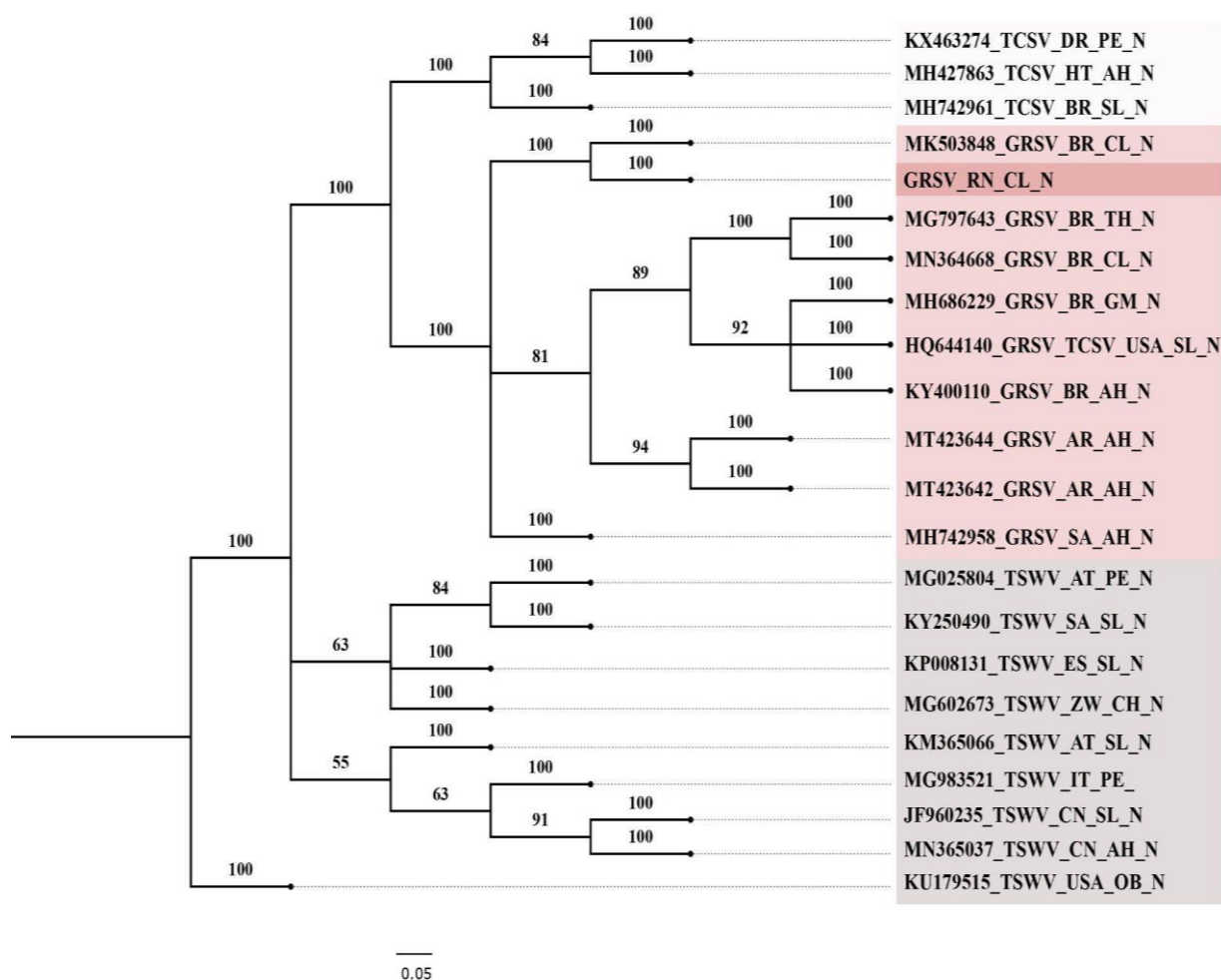
⁵ Comprimento total de nucleotídeo da sequência analisada

Análise filogenética

Vinte e uma sequências depositadas no GenBank, além da sequência montada de GRSV (GRSV_RN) foram utilizadas para a inferência bayesiana utilizando o gene N como descrito na metodologia.

A topologia da árvore mostra a formação de três clados distintos, GRSV, TCSV e TSWV partindo de um mesmo ancestral comum. A sequência nucleotídica do gene N de GRSV_RN, descrito na árvore como GRSV_RN_CL_N, foi agrupada com alto nível de confiança no clado de GRSV, formando um grupo irmão com o isolado MK5348_GRSV_CL_N como mostra a Figura 7.

Figura 7 - Árvore filogenética baseada na sequência do gene N.



A história evolutiva foi inferida usando o método de inferência Bayesiana e o modelo de substituição HKY+G. Foram utilizadas 22 sequências de nucleotídeos de diferentes espécies virais (GRSV, TCSV e TSWV), com um total de 777 (posições por sequência) no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MrBayes v.3.2.7 em uma

corrida de 10 milhões de gerações, onde a árvore final obtida apresentou uma probabilidade de log de -3040.784 e um desvio padrão final de 0.004. A barra de escala (0,05) representa o número de substituições de nucleotídeos por sítio. As numerações nos ramos representam a probabilidade a *posteriori*. A etiqueta dos ramos segue as seguintes características: número de acesso acrônimo do vírus_país_hospedeiro_gene (Tabela 2).

As análises do SDT (Tabela 8) resultaram em comparações de identidades pareadas das sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) dos genes N, NSs; GP, NSm e L do isolado GRSV_RN contra as sequências virais de GRSV, TCSV e TSWV. A maior identidade de 98,8% a nível de nt foi calculada para a sequência N de GRSV do isolado de melancia (MK503848). Identidades inferiores a 90% foram obtidas com sequências de N de TCSV e TSWV. A nível de aa, a maior identidade de 100% foi calculada para as sequências N de GRSV de acesso MK503848, enquanto que identidades menores que 90% foram obtidas para as sequências de aa de N de TCSV e TSWV. A sequência NSs de GRSV_RN, tanto a nível de nt (94.9%) quanto a nível de aa (97.2%) mostrou a maior identidade com a sequência recombinante do isolado de GRSV de tomate encontrado na Flórida (HQ644140, L_GM_TS_G). Já para o gene da GP, a maior identidade de 98.8% a nível de nt foi observada com a sequência GP de GRSV isolado de melancia (MK503850) e a nível de aminoácido a maior identidade foi de 99.0% com sequências GP de GRSV, isolado de planta de melancia (MK503850). Interessantemente, o gene GP de GRSV_RN compartilha identidades máximas de 91.3% e 93.9% a nível de nt e aa, respectivamente, com sequências do isolado BR-03 de TCSV do Brasil (MH742960). Identidades menores que 90% foram observadas entre sequências de GP de GRSV_RN e TSWV a nível de nt e aa. A sequência do gene NSm apresentou as maiores identidades (98.2% nt, 100.0% aa) com as sequências do isolado de melancia de GRSV do Piauí (MK503850). A maior identidade com sequências de NSm de TCSV foi encontrada com sequências de TCSV do isolado BR-03 do Brasil (MH742960) (91.9% nt, 94.4% aa). Para o gene L, a maior identidade a nível de nt (98.9%) e de aa (99.6%) foi obtido com a sequência de GRSV isolado de melancia no Piauí (MK503849). A análise comparativa com as sequências de L de TCSV mostrou a nível de nt identidades inferiores a 90%, mas a nível de aa identidades de 92.6% foram obtidas com sequências de isolados de TCSV da República Dominicana (KX463272, MH427861 e MH742959).

Tabela 8 - Identidades pareadas de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos em porcentagem (%) dos genes N, NSs; GP, NSm e L de GRSV avaliados no programa SDT.

		SEGMENTO S					
		³ Gene N		³ Gene NSs			
¹ Acesso	² vírus / isolado	Id (%nt aa)		¹ Acesso	² vírus/isolado	Id (% nt aa)	
GRSV_RN	GRSV	100	100	GRSV_RN	GRSV	100	100
MK503848	GRSV-GRSVPI	98.8	100	MN364668	GRSV- GRSV-W-TO_S	94.7	96.4
MH742958	GRSV-AS-5	94.5	96.5	MT723993	GRSV- DSMZ-PV0205	94.7	96.6
MT723993	GRSV-DSMZPV-25	94.5	96.5	MH742958	GRSV - SA-05	94.7	96.6
MN364668	GRSV- GRSV-W-TO_S	93.4	96.9	MN364668	GRSV- GRSV-W-TO_S	94.7	96.4
MG797643	GRSV-UFT/214	93.4	96.9	MG797643	GRSV- UFT/214	94.7	96.4
MH686229	GRSV-LEM	93.2	97.3	KT972593	GRSV- AR	94.9	96.6
HQ644140	L _G M _T S _G	93.2	96.9	KY400110	GRSV - GRAR-S	94.5	96.6
KY400110	GRSV-GRAR-S	93.4	97.3	MH686229	GRSV - LEM	94.6	96.6
MT423640	GRSV_Villa_Reduccion_A	92.9	96.9	HQ644140	L _G M _T S _G	94.9	97.2
MT423644	GRSV-Malena	92.8	96.9	KX463274	TCSV - DR	84.7	88.6
KT972594	GRSV-GRSV-AR	93.7	97.3	MH427863	TCSV - Haiti	84.5	88.4
MT423629	GRSV-Hernando	93.8	96.5	MH742961	TCSV - BR-03	84.1	88.0
MT423628	GRSV-Pampayasta_B	93.6	97.3	MG602673	TSWV - Mum-A5	77.5	80.5
MT423635	GRSV_General_Deheza_D	93.7	97.3	KY250490	TSWV - LK-1	78.0	81.5
MT423636	GRSV_Gigena	93.4	96.9	KT160282	TSWV- PA01	77.8	80.9
MT423645	GRSV-Santa_Eufemia	93.6	97.3	KM365066	TSWV - WA7	78.8	81.5
MT423642	GRSV_El Crispin	94.3	97.3	MN365037	TSWV - YNHS	78.8	82.2
MT423630	GRSV-General_Deheza_A	93.7	97.3	KU976396	TSWV - TSWV-LE	78.8	82.0
MT423633	GRSV- General_Deheza_C	93.8	97.3	HM581942	TSWV - Pepper2 CY-CN	78.1	81.8
MT423646	GRSV-Villa_ascasubi	93.8	97.3	JF960235	TSWV - TSWV-YN	78.8	82.0
MT423643	GRSV_General_Fotheringham	93.8	97.3	MT723987	TSWV - DSMZ PV-0389	78.4	82.4

Continuação da Tabela 8

MT423631	GRSV-Rio_Cuarto_A	94.2	97.3				
MT423638	GRSV-Rio_Cuarto_B	94.2	97.3				
MT423632	GRSV-Beneral_Deheza_B	94.0	97.3				
MT423634	GRSV-Manfredi_B	94.0	96.9				
MT423639	GRSV-Dalmacio_Velez	94.1	97.3				
MH742961	TCSV-BR-03	82.0	87.1				
KY910826	TCSV-NY1603	82.0	86.7				
KX463274	TSWV-DR	82.4	87.5				
MH427863	TCSV-Haiti	82.4	87.5				
KP172480	TCSV 10-10-14	82.6	87.5				
HM581942	TSWV-Pepper2 CY-CN	76.7	79.7				
KM365066	TSWV - WA7	77.1	79.7				
JF960235	TSWV-TSWV-YNHS	76.6	79.3				
KU976396	TSWV - TSWV-LE	77.0	80.1				
MN365037	TSWV-YNHS	77.0	80.1				
KY250490	TSWV-LK1	77.2	79.7				
KT160282	TSWV-PA01	77.1	79.3				
MT723987	TSWV-DSMZ PV-389	76.1	79.8				
SEGMENTO M							
³ Gene GP				³ Gene NSm			
¹ Acesso	² vírus/ isolado	Id (% nt aa)		¹ Acesso	² vírus/ isolado	Id (% nt aa)	
GRSV_RN_	GRSV	100	100	GRSV_RN	GRSV	100	100
MK503850	GRSV-GRSV-PI	98.8	99.0	MK503850	GRSV-GRSV-PI	98.2	100
MN364669	GRSV-GRSV-W-TO_S	91.1	94.5	MN364669	GRSV-GRSV-W-TO_S	94.4	96.7
MT723992	GRSV-DSMZ-PV0205	91.4	94.4	MT723992	GRSV-DSMZ-PV0205	92.2	94.7

Continuação da Tabela 8

MH742957	GRSV-SA-05	91.3	94.5	MH742957	GRSV-SA-05	92.3	94.7
AY574055	GRSV-SA-05	91.1	94.3	KT972591	GRSV-AR	92.0	94.7
KT972592	GRSV-AR	90.6	94.1	AF213673	GRSV-BR	92.0	94.7
KY350137	GRSV-BR	91.5	94.0	KY350137	GRSV-BR	92.1	94.1
MH686227	GRSV-LEM	90.2	93.0	MH686227	GRSV-LEM	91.7	94.1
HQ644141	L _G M _T S _G	90.8	93.2	HQ644141	L _G M _T S _G	91.4	94.1
AY574054	TCSV	91.3	93.8	KX463273	TCSV-DR	91.2	94.1
KX463273	TCSV-DR	90.7	93.4	MH427862	TCSV-Haiti	91.2	94.1
MH427862	TCSV-Haiti	90.7	93.4	MH742960	TCSV-BR-03	91.9	94.4
MH742960	TCSV-BR-03	91.3	93.9	MG602672	TSWV-Mum-A5	77.7	84.1
MG602672	TSWV-Mum-A5	76.3	80.1	KY250489	TSWV-LK-1	77.6	84.4
KY250489	TSWV-LK-1	76.3	80.6	KT160281	TSWV-PA01	77.4	85.1
KT160281	TSWV-PA01	76.3	80.0	KM365065	TSWV-WA7	77.6	84.4
KM365065	TSWV-WA7	75.9	80.3	MN365035	TSWV-YNHS	76.7	84.1
MN365035	TSWV-YNHS	76.0	80.2	KU976395	TSWV-TSWV-LE	77.9	84.4
KU976395	TSWV-TSWV-LE	76.1	80.5	HM581941	TSWV-Pepper2 CY-CN	77.8	84.4
HM581941	TSWV-Pepper2 CY-CN	76.4	80.2	JF960236	TSWV-TSWV-YN	76.6	84.4
JF960236	TSWV-TSWV-YN	76.1	80.5	MT723986	TSWV-DSMZ PV-0389	77.8	84.4
MT723986	TSWV-DSMZ PV-0389	76.2	80.6				

SEGMENTO L

³ Gene L

¹ Acesso	² vírus / isolado	Id (% nt aa)	
GRSV_RN_	GRSV	100	100
MK503849	GRSV-GRSV-PI	98.9	99.6
MN364670	GRSV- GRSV-W-TO_S	90.9	96.7
MT723991	GRSV - DSMZ-PV0205	90.7	96.0

Continuação da Tabela 8

MH742956	GRSV - SA-05	90.7	96.1
KT972590	GRSV - GRSV-AR	90.3	96.5
KY350136	GRSV - BR	89.9	96.3
MH686228	GRSV - LEM	90.0	96.4
HQ644142	L _G M _T S _G	89.7	96.2
KX463272	TCSV - DR	81.0	92.6
MH427861	TCSV - Haiti	81.0	92.6
MH742959	TCSV - BR-03	81.0	92.6
MG602671	TSWV - Mum-A5	78.0	88.4
KY250488	TSWV - LK-1	78.0	88.7
KT160280	TSWV - PA01	78.0	88.5
KM365064	TSWV - WA7	78.0	88.7
MN365036	TSWV - YNHS	78.1	88.8
KU976394	TSWV - TSWV-LE	78.2	87.3
HM581940	TSWV - Pepper2 CY-CN	77.9	88.8
JF960237	TSWV - TSWV-YN	78.0	87.1
MT723985	TSWV - DSMZ PV-0389	78.1	88.6

Id: identidade de pares, nt: nucleotídeo, aa: aminoácido.

¹ Acesso utilizado para a análise

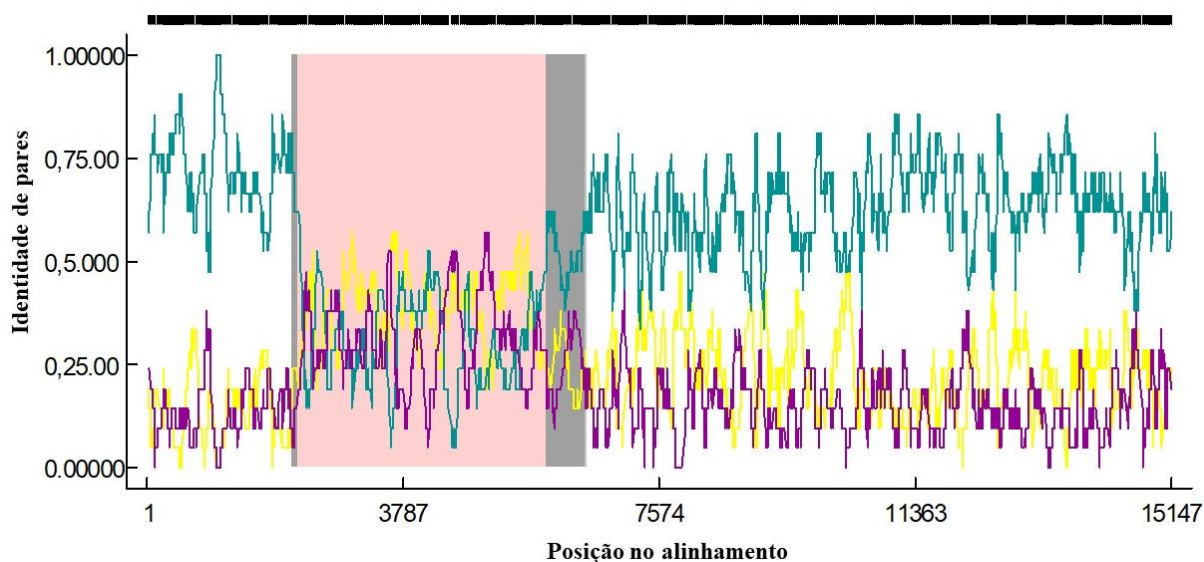
² Espécie e respectivo isolado analisados

³ Resultado da análise do gene de acordo com cada segmento

Recombinação

Com base na percepção de identidade entre o segmento M de TCSV e GRSV_RN e por haver relatos já descritos sobre eventos de pseudorecombinação entre os mesmos (Silva et al. 2019, Webster et al. 2011), optou-se por investigar a sequência M do GRSV_RN. Conforme a análise exploratória completa do RDP4 não foi possível identificar sinais significativos de recombinação entre os segmentos M do GRSV_RN montado e M de TCSV isolado de tomate (*Solanum lycopersicum*). Os seguintes eventos foram detectados pelos métodos RDP ($8,459 \times 10^{-06}$), MaxChi ($7,242 \times 10^{-18}$), Chimaera ($3,974 \times 10^{-16}$), Phylpro ($2,486 \times 10^{-14}$) e LARD ($3,128 \times 10^{-29}$) com relativamente baixos valores de p (p -value).

Figura 8 - Determinação de regiões de pseudorecombinação usando o programa RDP4.



A região destacada entre as barras verticais cinza mostra os putativos sinais de um evento de recombinação. Gráficos para comparar GRSV_BR_C. lanatus e TCSV_BR_S. lycopersicum; GRSV_BR_C. lanatus e GRSV_RN_C. lanatus; TCSV_BR_S. lycopersicum e GRSV_RN_C. lanatus estão em amarelo, azul e roxo, respectivamente. O GRSV_BR_C. lanatus foi considerado o maior parental (*major parent*) e o TCSV_BR_S. lycopersicum o menor (*minor parent*). Um total de sete sequências (GRSV, TCSV e TSWV) dos segmentos S (NSs, N), M (GP, NSm) e L (L) foram retirados do Genbank e tiveram seus genes concatenados, sendo representados por: GRSV_TCSV_USA_S.lycopersicum (HQ644140; HQ644141; HQ644142), GRSV_SA_A.hypogaea (MH742957;MH742958;MH742956), GRSV_BR_C.lanatus (MN364668;MN364669;MN364670) TCSV_BR_S.lycopersicum (MH742961;MH742960;MH742959), TCSV_HT_A.hypogaea (MH427863;MH427862;MH427861), TCSV_DR_capsicum (KX463274; KX463273; KX463272), TSWV_AT_S.lycopersicum (KM365066; KM365065; KM365064). O dataset proveniente do Genbank mais a sequência dos genes de GRSV_RN foram utilizados na análise de recombinação.

Estudo da gama de hospedeiros

A Tabela 9 mostra o resultado da inoculação mecânica realizada a partir do macerado de plantas de *N. benthamiana* (12 dpi) infectadas sistemicamente com um isolado de GRSV de melancia advindas de campos produtivos do Rio Grande do Norte - Mossoró. A infecção nas plantas do estudo da gama de hospedeiras foi confirmada com base na expressão dos sintomas, Dot - ELISA.

Tabela 9 - Análise da gama de hospedeiros.

GAMA DE HOSPEDEIROS			
	² Início dos sintomas (dpi)	³ Sintomas (28 dpi)	⁴ Dot-ELISA (+/- nº total plantas)
¹ Solanaceae			
<i>Nicotiana benthamiana</i>	10	Ss: df	4/4
<i>Nicandra physalodes</i>	10	Ss: ac; df; ne; cl	6/10
<i>Physalis florida</i>	14	pnl	3/10
<i>Capsicum baccatum</i> var. Dedo – de – moça	-	ns	0/10
<i>Capsicum annuum</i> var. Sweet pepper yolo wonder	10	Ss: ci; rt	4/10
<i>Solanum lycopersicum</i> var. Santa Clara	18	Ss: mne	4/04
<i>Solanum lycopersicum</i> var. Santa Cruz	14	Ss: rt, df; mb.	3/10
Cucurbitaceae			
<i>Citrullus lanatus</i> var. Charleston gray	21	Ss: ne	4/10
<i>Citrullus lanatus</i> var. Congo	21	Ss: ne	2/10
<i>Citrullus lanatus</i> var. Crimson sweet	21	Ss: cf; rt	2/10
<i>Cucumis anguria</i> var. Maxixe Caipira do Norte	-	ns	0/10
<i>Cucumis sativus</i> var. Cucumber caipira	-	ns	0/10

Sintomas sistêmicos (Ss); anéis cloróticos (ac); deformação foliar (df); necrose (ne); clorose (cl); pontuações necróticas locais (pnl); nenhum sintoma (ns); clorose internerval (ci); redução de tamanho (rt); Manchas necróticas (caules, pecíolos, folha) (mne); manchas de bronze (mb); curvatura da folha (cf); não testado (ut). Número (nº); dias pós-inoculação (dpi); variedade (var.).

¹ Espécies e respectivas variedades utilizadas no estudo

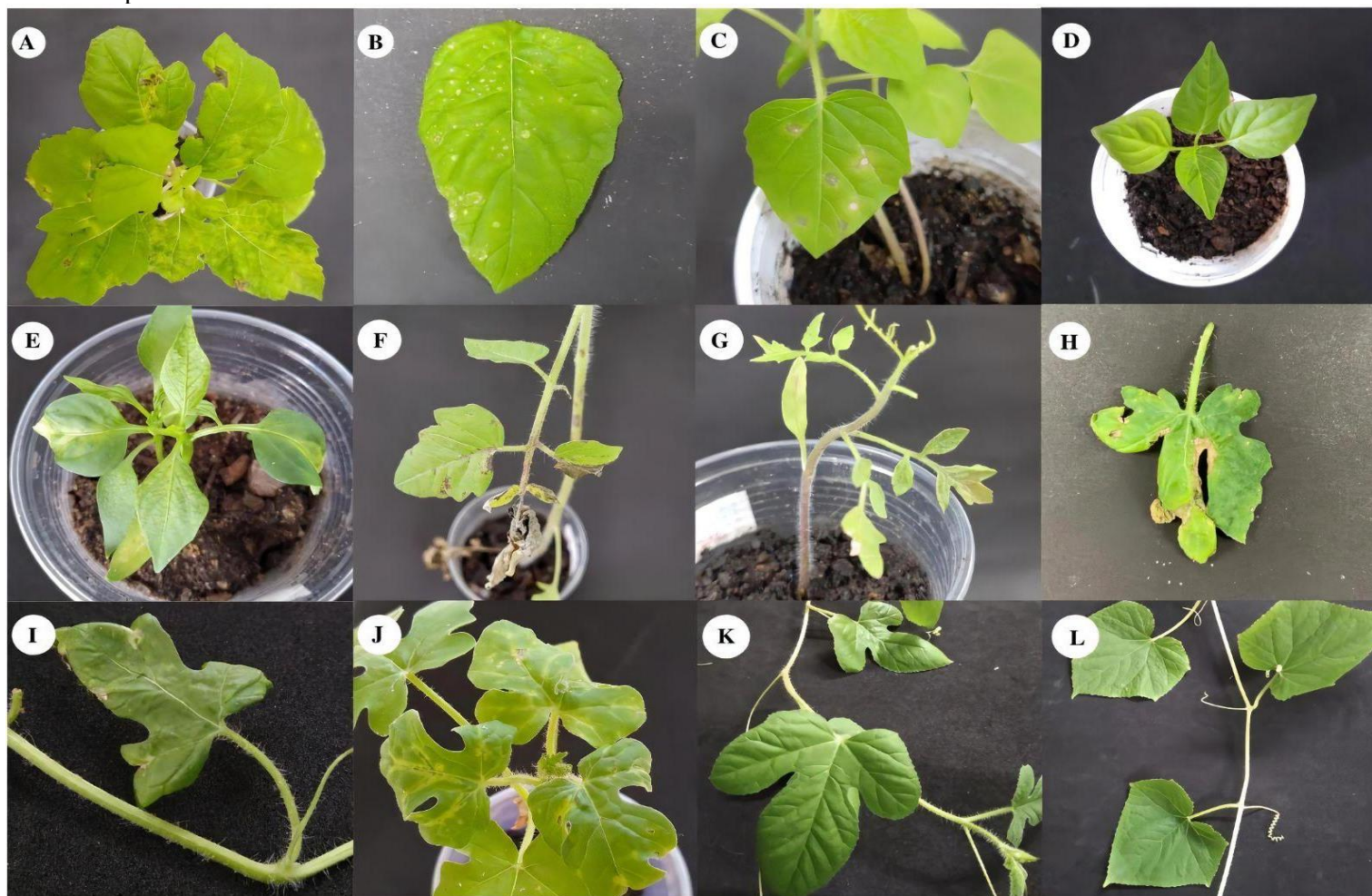
² Início dos sintomas para cada espécie

³ Sintomas expressos Resultado Dot-ELISA

⁴ Resultado Dot-ELISA

Conforme análise sorológica, nove espécies/variedades de um total de doze testadas foram positivas para a presença de GRSV, sendo elas: *Nicotiana benthamiana* (4 plantas positivas/4 plantas total e 1 foi confirmada positiva/RT-PCR); *Nicandra physalodes* (6 plantas positivas/10 plantas total e 1 foi confirmada positiva/RT-PCR); *Capsicum annuum* var. Sweet pepper yolo wonder (4/10); *Citrullus lanatus* var. Charleston Gray (4/10); *Solanum lycopersicum* var. Santa Clara (4/04); *Solanum lycopersicum* var. Santa Cruz (3/10); *Physalis florida* (2/10); *Citrullus lanatus* var. Congo (2/10); *Citrullus lanatus* var. Crimson sweet (2/10). A espécie *N. physalodes* foi a que expressou os sintomas mais acentuados e o maior número de plantas positivas. A espécie *N. physalodes* apresentou inicialmente sintomas sistêmicos de clorose e anéis cloróticos, seguidas de necrose e deformação foliar. A espécie *Physalis florida* apresentou sintomas locais de pontuações necróticas. A variedade de *Capsicum annuum* var. Sweet pepper yolo wonder apresentou sintomas sistêmicos de clorose internerval e redução de crescimento. A espécie *Solanum lycopersicum* var. Santa Clara inicialmente mostrou um sintoma severo de necrose de modo sistêmico, com posterior remissão dos sintomas em folhas nascentes, no entanto, as plantas de *Solanum lycopersicum* var. Santa Cruz apresentaram sintomas de deformação foliar (forte enrolamento das folhas apicais) de maneira sistêmica e bronzeamento das folhas de forma local, além de terem seu crescimento reduzido. A espécie *Citrullus lanatus* var. Charleston gray e *Citrullus lanatus* var. Congo apresentaram sintomas sistêmicos de necrose foliar, entretanto, o sintoma foi mais severo na variedade Charleston gray. Portanto, entre as melancias analisadas a variedade Charleston gray foi a que se mostrou mais susceptível ao vírus. A espécie *Citrullus lanatus* var. Crimson Sweet apresentou sintomas de curvatura foliar e redução de crescimento como mostra a figura 9.

Figura 9 - Gama de hospedeiras.



A, B - *Nicandra physaloides*; C - *Physalis florida*; D - *Capsicum baccatum* variedade Dedo – de – moça; E - *Capsicum annuum* var. Sweet pepper yolo wonder; F - *Solanum lycopersicum* var. Santa Clara; G - *Solanum lycopersicum* var. Santa Cruz; H - *Citrullus lanatus* var. Charleston gray; I - *Citrullus lanatus* var. Congo; J - *Citrullus lanatus* var. Crimson sweet; K - *Cucumis sativus* var. Cucumber caipira; L - *Cucumis sativus* var. Cucumber caipira.

DISCUSSÃO

No Brasil a cultura da melancia, até a descrição do momento, está suscetível a doenças virais causadas principalmente por nove espécies virais: CMV, WMV, SqMV, PRSV-W, ZYMV, ZLCV, GRSV como descrito por Kitajima et al. (2020) e WCLaV 1 e 2 (Maeda et al. 2021). As mesmas podem ser encontradas em associação mista como relatado por Yuki et al. (2000) e Aguiar et al. (2015), em que a exclusiva análise morfológica dos sintomas expressos não é capaz de afirmar se existe ou não uma ou mais espécies virais correlacionadas à expressão do sintoma. Portanto, há a necessidade de análises sorológicas e moleculares para diagnosticar e caracterizar corretamente as espécies virais associadas a doenças na cultura da melancia. Os sintomas de anéis necróticos observados em plantas de melancia nas regiões produtoras do Rio Grande do Norte e Ceará já foram relatados por Leão et al. (2015) em campos produtivos de melancia em São Paulo entre os anos de 2012 e 2013, e, recentemente por Pozzi et al. (2021) na Argentina em cultivos de melancia, sintomas que foram associados ao GRSV. Ressalta-se que ambos trabalhos observaram a presença de espécies de *tripes* em campo associados a plantas sintomáticas. Leão et al. (2015) identificou a espécie presente em São Paulo como *Frankliniella schultzei* e Pozzi et al. (2021) apenas fez a observação da presença de vetores em campo. Trabalhos como o desenvolvido por Webster et al. (2015) comprovam que espécies como *Frankliniella schultzei* e *Frankliniella occidentalis* são transmissoras de GRSV. Com base nestas informações, e em trabalhos que relatam os tripses como transmissores de orthotospovírus (Nagata et al. 2004; Rotenberg e Whitfield 2018), a população de tripses encontrada nos campos (plantas sintomáticas) de melancia foi identificada como sendo do gênero *Frankliniella* sp. (comunicação pessoal com Prof. Dr. Adriano Cavalleri, UFRG) e considerada como possível transmissora do vírus do GRSV em campo. No entanto, outros possíveis vetores, como por exemplo, *Aphis gossypii*, podem estar transmitindo outras espécies virais que contribuem para a sintomatologia encontrada em melancia em campo.

Mediante a sintomatologia, observada de maneira acentuada em campo, empregou-se a tecnologia do sequenciamento de nova geração para caracterização molecular viral do agente causador da doença, como já realizado em outros trabalhos (Chou et al. 2017; Ibaba e Gubba 2020; Luria et al. 2019; Xin et al. 2017). Essas tecnologias tornaram-se principais e essenciais para o descobrimento de sequências virais, e permitem a montagem de genomas novos ou genomas que já tenham sido

identificados (Churko et al. 2013; Jones et al. 2017). A utilização do HTS neste trabalho possibilitou a busca de todos os genomas presentes na amostra sequenciada, além de servir como uma importante fonte de dados para futuras análises de bioinformática (Olmos et al. 2018). Portanto, um dos objetivos deste trabalho visou a montagem de genomas virais de acordo com o pipeline estabelecido por Blawid et al. (2017). Duas estratégias de montagem podem ser utilizadas para a montagem de genomas virais, uma através de genomas de referência ou através da estratégia *de novo* (Moyer 1999). Contudo, neste trabalho, optamos por utilizar a estratégia *de novo* para a montagem da sequência genômica com o intuito de observar as possíveis variações no genoma montado, conforme demonstrado por Young et al. (2010). Após a montagem de cada segmento (S, M e L), as sequências foram comparadas por BLASTn/BLASTp. A sequência do segmento L de GRSV-RN montado compartilha 98,86% de identidade com a sequência do segmento L de GRSV de melancia do Piauí (número de acesso: MK503849) disposto no NCBI. A sequência do segmento M montado se assemelha em 98,45% com a sequência M de GRSV de melancia do Piauí (MK503850) e a sequência do segmento S montado mostrou ser 98,94% idêntica a sequência do gene N montado do isolado de GRSV de melancia advindas do Piauí (número de acesso: MK503848).

A sequência de múltiplos alinhamentos referentes ao gene N foi utilizada para a construção da árvore filogenética, através de inferência bayesiana que utiliza uma análise de múltiplas árvores através de modelos estocásticos e modelos com base no teorema de Bayes que dão origem a probabilidades *a posteriori* (Dunson 2001; Robert 2007). A árvore filogenética de espécies de orthotospovírus evidenciou a relação existente entre as três espécies analisadas (GRSV, TCSV e TSWV), em clados diferentes obedecendo um padrão já observado anteriormente por Camelo-García et al. (2014) e Leão et al. (2015). Todos os segmentos também foram trabalhados com base na similaridade de identidade de nucleotídeos e aminoácidos de seus genes. O gene N foi ressaltado nas análises, por ser mais conservado (Ávila et al., 1993) e utilizado como demarcador a nível de espécie. Ávila et al. (1993) propôs que com a análise deste gene é possível observar que as espécies GRSV, TCSV e TSWV se separam em sorogrupos (TSWV pertencente ao sorogrupo I e GRSV e TCSV do sorogrupo II). Feldhoff et al. (1997) mostrou que o anticorpo contra a proteína Gn/Gc de TSWV pode reagir com glicoproteínas de GRSV e TCSV. Portanto, os resultados positivos de ELISA utilizando o anticorpo TSWV podem ser o produto de reações cruzadas com proteínas de GRSV e TCSV.

Além de apresentarem alta identidade, as espécies trabalhadas neste estudo são segmentadas, possibilitando a ocorrência de frequentes rearranjos e recombinações (Vijaykrishna et al. 2015; Webster et al. 2011). Mediante ao conhecimento dessa informação, também buscou-se, com a utilização das sequências dos genes concatenados de TSWV, GRSV e TCSV, identificar a presença de possíveis eventos de recombinação. As análises com o RDP4 não apontaram evento/eventos de pseudorecombinação na sequência do GRSV_RN montado, pois o *p-value* calculado não foi considerado significativo. Na literatura podemos encontrar trabalhos referentes a eventos de recombinação entre GRSV e TCSV. O primeiro relato de pseudorecombinação foi demonstrado por Webster et al. em 2011, que relacionou a sequência do isolado de GRSV da Flórida-EUA L_GM_TS_G (número de acesso: HQ644141) como um recombinante. As análises realizadas com o isolado L_GM_TS_G indicaram a presença de um evento de recombinação em que o GRSV sofreu recombinação com o segmento M de TCSV. O segundo relato de recombinação foi realizado por Silva et al. (2019), sugerindo um resultado diferente para o segmento do isolado BR-03 (número de acesso: MH742960). Silva et al. (2019) sugerem em análises de diversidade de nucleotídeos do segmento M, que TCSV incorporou o segmento M de GRSV através de provável evento de pseudorecombinação, pois os segmentos nucleotídicos apresentam baixa diversidade acumulada. Os autores sugerem que o genótipo parental de TCSV foi eliminado ou ainda deve ser descoberto. A coinfeção por dois ou mais vírus em um único hospedeiro pode favorecer eventos de recombinação (troca de fragmentos genômicos) ou o rearranjo (troca de segmentos inteiros) (Simon-Loriere e Holmes 2011; Vijaykrishna et al. 2015). Esse tipo de evento é uma das principais forças evolutivas em vírus segmentados de RNA de fita simples, sendo o isolado viral passível a adaptações a novos hospedeiros e condições ambientais (Lian et al. 2013; Sanjuán e Domingo-clap 2016). Apesar de trabalhos como o realizado por Lian et al. (2013), que consideraram significativos valores de *p* de $1,0 \times 10^{-6}$ em análises de recombinação com a espécie TSWV, optamos por não considerar valores significativos valores de *p* de 10^{-8} a 10^{-29} . Considerando que o número de sequências completas para análise é baixo e, portanto, falsos positivos podem ocorrer (Halsey 2019), não é possível afirmar com as análises de recombinação a existência de eventos de pseudorecombinação com a sequência do isolado de GRSV_RN.

A escolha das espécies de plantas para o teste biológico foi baseada na gama de hospedeiros que o GRSV abrange e em trabalhos já desenvolvidos referentes a isolados

de melancia (Leão et al. 2015) e de outros, como por exemplo, o amendoim (Camelo-García et al. 2014). Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por Leão et al. (2015) referente ao GRSV de melancia, exceto pelo resultado referente a infecção das variedades de tomate. Leão et al. (2015) realizaram a inoculação mecânica do isolado de melancia na variedade de tomate Santa Clara (essa variedade também é abordada neste trabalho) e não constataram infecção, enquanto, os experimentos do presente trabalho confirmaram a infecção de GRSV_RN por Dot-ELISA tanto na variedade de tomate Santa Clara, quanto na variedade Santa Cruz. Portanto, divergentes quando comparado ao obtido por Leão et al. (2015). A infecção com GRSV_RN se mostrou sistêmica, entretanto, a distribuição dos sintomas foi atípica para a variedade Santa Clara, onde os sintomas restringiam-se à parte basal e mediana da planta não sendo visualizados na parte apical da planta. Interessantemente, posteriormente, observamos uma recuperação das plantas. Uma hipótese que pode explicar o fenômeno foi descrita por Góngora-Castillo et al. (2012), que relatam esse processo como “remissão”. Góngora-Castillo et al. (2012) observaram em teste, que plantas de pimenta infectadas com o pepper golden mosaic virus (PepGMV), após a expressão severa de sintomas nas folhas basais, teve uma drástica redução da expressão dos sintomas conforme a emergência das novas folhas apicais e isso prolongou-se até a emergência de folhas assintomáticas. Wingard (1928) também observou o mesmo comportamento em erva daninha. Bengyella et al. (2015) relaciona essa condição ao grau de resposta inicial da imunidade basal do hospedeiro. A variedade Santa Cruz mostrou sintomas sistêmicos, entretanto, persistentes. Analisando-se os sintomas nas variedades de melancia foi possível observar que os sintomas expressos foram mais atenuados que os sintomas observados em campo, onde podemos levantar a hipótese de que a severidade da doença em campo pode estar associada a presença de infecção mista que proporcione sinergismo ao mesmo (Bag et al. 2012). Na literatura trabalhos como o desenvolvido por Bag et al. (2012) demonstraram em experimento de casa vegetação que a coinfeção de IYSV e TSWV ocasionam a expressão de graves sintomas sistêmicos em plantas de *Datura stramonium*. Rentería-Canett et al. (2011) também observaram que a coinfeção entre as geminivíroses por pepper golden mosaic virus (PepGMV) e pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV) ocasionam maior severidade dos sintomas em plantas de pimenta. Relatos iguais a esses embasam a hipótese de que a infecção mista encontrada nas amostras de melancia esteja correlacionada com a severidade do sintoma em campo. Trabalhos futuros precisam ser

realizados de modo mais abrangente e profundo para elucidar a sintomatologia em campo observada em plantas de melancia da região produtora do Rio Grande do Norte e Ceará.

Concluindo, foi possível montar as sequências do genoma viral de GRSV isolado de melancia via análise de bioinformática e molecular, indicando a presença do GRSV nas áreas produtivas de melancia de Mossoró e Ceará. Ao contrário de outros estudos, o presente trabalho mostrou que este isolado de GRSV infecta a espécie *Solanum lycopersicum* variedades Santa Clara e Santa Cruz, através da determinação da gama de hospedeiros. Em um contexto geral, sugere-se que mais análises sejam realizadas para identificação do que possibilitou a adaptação do GRSV a hospedeira melancia no Brasil, bem como um levantamento epidemiológico da distribuição da doença, no intuito de minimizar danos produtivos e econômicos ocasionados por este novo isolado, e de coordenar ações alternativas no controle da doença.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. A coleta do material a ser analisado e a preparação para seu sequenciamento foram feitas por Tatiane Santos da Silva. O sequenciamento desse material foi realizado por Paolo Margaria, Stephan Winter. Análises sorológicas, moleculares e bioinformáticas foram realizadas em colaboração com Tatiane Santos da Silva, Alejandro Risco Mendoza e Rosana Blawid. A obra foi escrita por Tatiane Santos da Silva e Rosana Blawid. Todos os autores comentaram a versão do manuscrito. Paolo Margaria, Stephan Winter e Rosana Blawid corrigiram a versão traduzida. Todos os autores leram e aprovaram o artigo final.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os conjuntos de dados gerados durante e / ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis com o autor correspondente, mediante solicitação razoável.

RECONHECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto DSMZ, da Alemanha, pela realização do sequenciamento, e ao Dr. Diêgo Rodrigues Soares Nogueira pela intermediação e viabilização do contato nas áreas produtoras onde foram realizadas as coletas. Agradeço ao CNPq, ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Laboratório de Virologia da UFRPE e a todos os meus colegas que de alguma forma contribuíram para o andamento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abudurexiti A, Adkins S, Alioto D, Alkhovsky SV, Avšič-Županc T, Ballinger MJ, Dennis A, Bente DA, Beer M, Bergeron E, Blair CD, Briesse T, Buchmeier MJ, Burt FJ, Calisher CH, Cháng C, Charrel RN, Choi IR, Clegg JCS, Torre JC, Lamballerie X, Dèng F, Di Serio F, Digiaro M, Drebot MA, Duàn XO, Ebihara H, Elbeaino T, Ergünay K, Fulhorst CF, Garrison AR, Gão GF, Gonzalez JPJ, Groschup MH, Günther S, Haenni AL, Hall RA, Hepojoki J, Hewson R, Hú Z, Hughes HR, Jonson MG, Junglen S, Klempa B, Klingström J, Kòu C, Laenen L, Lambert AJ, Langevin SA, Liu D, Lukashevich IS, Luò T, Lü C, Maes P, Souza WM, Marklewitz M, Martelli GP, Matsuno K, Mielke-Ehret N, Minutolo M, Mirazimi A, Moming A, Mühlbach HP, Naidu R, Navarro B, Nunes MRT, Palacios G, Papa A, Pauvolid-Corrêa A, Pawęska JT, Qiáo J, Radoshitzky SR, Resende RO, Romanowski V, Sall AA, Salvato MS, Sasaya T, Shěn S, Shí X, Shirako Y, Simmonds P, Sironi M, Song JW, Spengler JR, Stenglein MD, Sū Z, Sūn S, Táng S, Turina M, Wáng B, Wáng C, Wáng H, Wáng J, Wèi T, Whitfeld AE, Zerbini FM, Zhāng J, Zhāng L, Zhāng Y, Zhang YZ, Zhāng Y, Zhou X, Zhū L, Kuhn HJ (2019) Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. Archives of Virology 164:1949-1965

Aguiar RWS, Evangelista MP, Ramos ACC, Pascoal PV, Barros HB, Santos MM (2013) Danos e sintomatologia de vírus associado à cultura da melancia no estado do Tocantins. Bioscience Journal 29:1632-1639

Aguiar RWS, Rodrigues A, Portella ACF, Lopes MM, Lima MF, Resende RO, Nagata T (2015) Serological identification of virus in watermelon production fields in the tocantins state. Brazilian Archives of Biology and Technology 58:192-197

Ávila AC, De Haan P, Kormelink R, Resende RO, Goldbach RW, Peters D (1993) Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. Journal of General Virology 74:153-159

Ávila AC, Vecchia PTD, LIN MT, d'OLIVEIRA LOB, ARAUJO JP (1984) Identificação do vírus do mosaico da melancia em melão (*cucumis melo*) e melancia (*citrullus lanatus*) na região do submédio São Francisco. Fitopatologia Brasileira 9:113-117

Bag S, Mitter N, Eid S, Pappu HR (2012) Complementation between Two Tospoviruses Facilitates the Systemic Movement of a Plant Virus Silencing Suppressor in an Otherwise Restrictive Host. PLoS One 7:1-9

Barbieri RL, Stumpf ER (2008) Origem e evolução de plantas cultivadas. 1º Ed. EMBRAPA, Brasília

Bengyella L, Waikhom SD, Allie F, Rey C (2015) Virus tolerance and recovery from viral induced-symptoms in plants are associated with transcriptome reprogramming. Plant Molecular Biology 89:243-252

Biomatters (2018) Geneious 11.0. Available at: <https://assets.geneious.com/manual/11.0/GeneiousManual.html>. Accessed on: mayo 13, 2020

- Blawid R, Silva JMF, Nagata T (2017) Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline. *Annals of Applied Biology* 170:301-314
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120
- Bucher E, Sijen T, Haan P, Goldbach R, Prins M (2003) Negative-Strand Tospoviruses and Tenuiviruses Carry a Gene for a Suppressor of Gene Silencing at Analogous Genomic Positions. *Journal of virology* 77:1329
- Camelo-Garcia VM, Lima EFB, Mansilla-Cordova PJ, Marques Rezende JA, Kitajima EW, Barreto M (2014) Occurrence of Groundnut ringspot virus on Brazilian peanut crops. *Journal of General Plant Pathology* 80:282-286
- Canto T, Prior DAM, Hellwald K-H, Oparka KJ, Palukaitis P (1997) Characterization of Cucumber Mosaic Virus IV. Movement Protein and Coat Protein Are Both Essential for Cell-to-Cell Movement of Cucumber Mosaic Virus. *Virology* 237:237-248
- Cavalcante IHL, Rocha LF, Silva Júnior GB, Amaral FHC, Falcão Neto R, Nóbrega JCA (2010) Fertilizantes orgânicos para o cultivo da melancia em Bom Jesus-PI. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 5:518-524
- Chen Z, Anane RF, Wang, Gao L, Chen L, Li S, Wen G, Zhao M (2021) Complete genome sequence analysis of a novel bunyavirus isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Archives of Virology* 166:2045-2050
- Chomicki G, Schaefer H, Renner SS (2019) Origin and domestication of Cucurbitaceae crops: insights from phylogenies, genomics and archaeology. *New Phytologist* 226:1240-1255
- Chomicki G, Renner S (2014) Watermelon origin solved with molecular phylogenetics including Linnaean material: another example of museomics. *New pathologist* 205:526-532
- Chou WC, Lin SS, Yeh SD, Li SL, Peng YC, Fan YH, Chen TC (2017) Characterization of the genome of a phylogenetically distinct tospovirus and its interactions with the local lesion-induced host *Chenopodium quinoa* by whole-transcriptome analyses. *PLoS One* 12:1-23
- Churko JM, Mantalas GL, Snyder MP, Wu JC (2013) Overview of high throughput sequencing technologies to elucidate molecular pathways in cardiovascular diseases. *Circulation Research* 112:1613-1623
- Cortez I, Saaijer J, Wongjkaew KS, Pereira A-M, Goldbach R, Peters D, Kormelink R (2001) Identification and characterization of a novel tospovirus species using a new RT-PCR *Archives of Virology* 146: 265-278

Darriba D, Posada D (2016) Manual: jModelTest 2. Manual 1-27. Available at: http://www.phylo.org/pdf_docs/jmodeltest-2.1.6-manual.pdf. Access on may 21, 2021

Dunson DB (2001) Commentary: Practical advantages of Bayesian analysis of epidemiologic data. *American Journal of Epidemiology* 153:1222-1226

FAO (2020). WATERMELON. Available at: <http://www.fao.org/land-water/databases-andsoftware/crop-information/watermelon/en/>. Accessed on may 15, 2021

Feldhoff A, Kikkert M, Kormelink R, Krczal G, Goldbach R, Peters D (1997) Serological comparison of tospoviruses with polyclonal antibodies produced against the main structural proteins of tomato spotted wilt virus. *Archives of virology* 142:781-93

Góngora-Castillo E, Ibarra-Laclette E, Trejo-Saavedra DL, Rivera-Bustamante RF (2012) Transcriptome analysis of symptomatic and recovered leaves of geminivirus-infected pepper (*Capsicum annuum*). *Virology Journal* 9:1-16

Gracia O, Borbon CM, Millan NG, Cuesta GV (1999) Occurrence of Different Tospoviruses in Vegetable Crops in Argentina. *Journal of Phytopathology* 147:223-227

Halfeld-Vieira BA, Ramos NF, Rabelo Filho FAC, Gonçalves MFB, Nechet KL, Pereira PRVS, Lima JAA (2004) Identificação sorológica de espécies de potyvirus em melancia, no estado de Roraima. *Fitopatologia Brasileira* 29:687-689

Halsey LG (2019) The reign of the p-value is over: what alternative analyses could we employ to fill the power vacuum? *Biology Letters* 15: 20190174

Hawkes R, Ninday E, Gordon J (1982) A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies. *Analytical biochemistry* 119:142-147

Hora RC da, Camargo Junior OA, Buzanini AC (2018) Cucurbitáceas e outras. In: Brandão Filho JUT, Freitas PSL, Berian LOS, Goto R, comps. *Hortaliças-fruto* [online]. Maringá: EDUEM. pp. 71-111

Hull R, Center JI (2014) *Plant virology*. 5^o Ed. Academic press, Amsterdã

Ibaba JD, Gubba A (2020) High-throughput sequencing application in the diagnosis and discovery of plant-infecting viruses in Africa, a decade later. *Plants* 9:1-22.

Jones S, Baizan-Edge A, MacFarlane S, Torrance L (2017) Viral diagnostics in plants using next generation sequencing: Computational analysis in practice. *Frontiers in Plant Science* 8:1770

Kitajima EW (2020) An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). *Biota Neotropica* 20(2): e20190932

- Knizewski L, Kinch LN, Grishin NV, Rychlewski L, Ginalski K (2007) Realm of PD-(D/E) XK nuclease superfamily revisited: detection of novel families with modified transitive meta profile searches. *BMC Structural Biology* 7:40
- Kormelink R, de Haan P, Meurs C, Peters D, Goldbach R (1993) The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal General Virology* 74:2795-2804
- Kormelink R, Verchot J, Tao X, Desbiez C (2021) The bunyavirales: The plant-infecting counterparts. *Viruses* 13:1-35
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549
- Lamb DC, Lei L, Warrilow AG, Lepesheva GI, Mullins JGL, Waterman MR, Kelly S L (2009) The First Virally Encoded Cytochrome P450. *Journal Virology* 83:8266-8269
- Leão EU, Spadotti DMA, Rocha KCG, Pantoja KFC, Rezende JAM, Pavan MA, Krause-Sakate R (2015) *Citrullus lanatus* is a New Natural Host of Groundnut ringspot virus in Brazil. *Journal of Phytopathology* 163:1014-1018
- Leonel LAK, Zárte NAH, Vieira MC, Marchetti ME (2000) Yield of seven genotypes of watermelon (*Citrullus lanatus*) in Dourados. *Horticultura Brasileira* 18:3
- Lian S, Lee JS, Cho WK, Yu J, Kim MK, Choi HS, Kim KH (2013) Phylogenetic and Recombination Analysis of Tomato Spotted Wilt Virus. *Plos One* 8:5
- Lima JAA, Amaral MRG (1985) Purificação e sorologia de "squash mosaic virus" isolado de melancia. *Fitopatologia Brasileira* 10:605-611
- Lima MF, Barbosa LF, Ávila AC (1997) Levantamento de viroses na cultura da melancia na região do submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22:337
- Lima MF, Oliveira VR, Amaro GB (2017) Cucurbit-infecting viruses in Brazil. *Acta Horticulturae* 1151:251-258.
- Lima MF, Queiroz MA, Dias RCS (1999) Avaliação de germoplasma de melancia a viroses no Submédio do vale São Francisco. *Horticultura Brasileira* 17:20-22
- Lima JA de A, Nascimento AKQ, S. Barbosa G Da, Da Silva FR (2012) Viruses Infecting Melon and Watermelon in Northeastern Brazil. *Virus Reviews & Research* 17:1-2
- Lowry VK, Smith JW, Mitchell FL (1992) Life-Fertility Tables for *Frankliniella fusca* (Hinds) and *F. occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) on Peanut. *Annals of the Entomological Society of America* 85:744–754.

Luria N, Smith E, Sela N, Koren A, Lachman O, Dombrovsky A (2019) Insights into a watermelon virome contribute to monitoring distribution of whitefly-borne viruses. *Phytobiomes Journal* 3:61–70.

Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol* 1:1-5.

Medeiros RB, Resende R, Carvalho RC, Costa CL, Sgro JY (2015) *Virologia vegetal: Conceitos, fundamentos, classificação e controle*. 1º Ed. UNB, Brasília

Menzel P, Ng KL, Krogh A (2016) Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *NATURE COMMUNICATIONS* 7:112573

Moyer JW (1999) Tospoviruses (*Bunyaviridae*). *Encyclopedia of Virology* 1803-1807

Muhire BM, Varsani A, Martin DP (2014) SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One* 9: e108277.

Nagata T, Almeida ACL, Resende RO, De Ávila AC (2004) The competence of four thrips species to transmit and replicate four tospoviruses. *Plant Pathology* 53:136-140

Nunes FCAP, Mousinho FEP, Oliveira JR, Lima CJGS, Ferreira VM (2017) Viabilidade econômica do cultivo irrigado da melancia no estado do Piauí. *Irriga* 22: 101-114

Olmos A, Boonham N, Candresse T, Gentit P, Giovani B, Kutnjak D, Liefteing L, Maree HJ, Minafra A, Moreira A, Nakhla MK, Petter F, Ravnikaar M, Rodoni B, Roenhorst JW, Rott M, Ruiz-García AB, Santala J, Stancanelli G, Vlught RV, Varveri C, Westenberg M, Wetzell T, Ziebell H, Massart S (2018) High-throughput sequencing technologies for plant pest diagnosis: challenges and opportunities. *EPPO Bulletin* 48:219-224

Pallás V, Sánchez-Navarro JA, James D (2018) Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Frontier in Microbiology* 9:1-11

Pekosz A, Gonzales-Scarano F (1996) The Extracellular Domain of La Crosse Virus G1 Forms Oligomers and Undergoes pH-Dependent Conformational Changes. *Virology* 225:243-247

Poltronieri L, Novaes Q, Dias P, Rezende AM, Trindade DR, Albuquerque FC, Kitajima EW (2000) Constatação do Zucchini yellow mosaic virus em cucurbitáceas no estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 25:669

Pozzi EA, Luciani CE, Giovani Celli M, Conci VC, Perotto MC (2021) *Citrullus lanatus*: un nuevo hospedante natural del Groundnut ringspot orthotospovirus en Argentina. *Agriscientia* 38:71-78

Rambaut A. (2010) FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. Available at: <https://github.com/rambaut/figtree/releases> Accessed on July 12, 2021

Rentería-Canett I, Xoconostle-Cázares B, Ruiz-Medrano R, Rivera-Bustamante RF (2011) Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal* 8:104

Robert CP (2007) *The Bayesian Choice: From Decision-Theoretic Foundations to Computational Implementation*. 2° Ed. Springer, France

Romão RL (2000) Northeast Brazil: A secondary center of diversity for watermelon (*Citrullus lanatus*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 207-213

Ronquist F, Huelsenbeck J, Teslenko M (2011) MrBayes Version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. Man MrBayes. Available at: https://github.com/NBISweden/MrBayes/blob/develop/doc/manual/Manual_MrBayes_v3.2.pdf Accessed on July 13, 2021

Rotenberg D, Whitfield AE (2018) Molecular interactions between tospoviruses and thrips vectors. *Current Opinion in Virology* 33:191-197

Sanjuán R, Domingo-Calap P (2016) Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73:4433-4448

Schaffer AA, Paris HS (2003) Melons, Squashes, and Gourds In: Caballero B *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition) Academic Press, Cambridge. pp 3817-3826

Singh S, Krishnareddy M (1996) Watermelon Bud Necrosis: A new tospovirus. *Acta Horticulturae* 441:68-77

Silva JMF, de Oliveira AS, de Almeida MMS, et al (2019) Tomato chlorotic spot virus (TCSV) putatively incorporated a genomic segment of groundnut ringspot virus (GRSV) upon a reassortment event. *Viruses* 11:87

Simon-Loriere E, Holmes EC (2011) Why do RNA viruses recombine? *Nature Reviews Microbiology* 9:617-626

Spadotti DMA, Leão EU, Rocha KCG, Agenor PM (2014) First report of Groundnut ringspot virus in cucumber fruits in Brazil. *New Dis Reports* 29:25-25.

Tavares AT, Silva EHCS, Ferreira TA, Ribeiro Marques KR, Nascimento IR (2017) Viruses occurring in watermelon in the tropical lowland of the Tocantins state, Brazil. *Revista de Ciências Agroambientais* 15:117-124

Ullman DE, Cho J, German L (1991) Occurrence and distribution of cucurbit viruses in the Hawaiian Islands. *Plant Disease* 75:367-370

Webster CG, Perry KL, Lu X, Horsman L, Frantz G, Mellinger C, Adkins S (2010) First Report of Groundnut ringspot virus Infecting Tomato in South Florida. *Plant Health Progress* 11:49

Webster CG, Reitz SR, Perry KL, Adkins S (2011) A natural M RNA reassortant arising from two species of plant- and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology* 413:216-225

Webster CG, Frantz G, Funderburk JE, Mellinger HC, McVoy E, Turechek WW, Marshall SH, Tantiwanich Y, McGrath MT, Daughtrey ML, Adkins S (2015) Emergence of Groundnut ringspot virus and Tomato chlorotic spot virus in Vegetables in Florida and the Southeastern United States. *Phytopathology* 105: 388-98

Wingard SA (1928) Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *Journal of Agricultural Research* 37:127-153

Xin M, Cao M, Liu, W, Yingdang R, Lu C, Wang X (2017) The genomic and biological characterization of *Citrullus lanatus* cryptic virus infecting watermelon in China. *Virus Research* 15:106-112

Young AL, Abaan HO, Zerbino D, et al (2010) A new strategy for genome assembly using short sequence reads and reduced representation libraries. *Genome Research* 20:249256

Yuki VA, Rezende JAM, Kitajima EW, et al (2000) Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of Sao Paulo, Brazil. *Plant Disease* 84:516-520

Zhao K, Rosa C (2020) Thrips as the transmission bottleneck for mixed infection of two orthospoviruses. *Plants* 9:509

CAPÍTULO III

Conclusões gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1 - A partir do sequenciamento HTS foi possível realizar a montagem das sequências de segmentos S (3039 nt), M (4857 nt) e L (8882 nt) de GRSV isolado da região de Mossoró/Ceará (GRSV_RN). As regiões gênicas foram analisadas pela ferramenta SDT, que indicaram alta identidade com sequências de isolados de GRSV do Piauí.

2 - As análises filogenéticas inferidas através de análise Bayesiana revelaram a formação de três clados distintos GRSV, TCSV e TSWV, e revelaram que o GRSV_RN agrupa-se com alto nível de confiança no clado de GRSV, e forma um grupo irmão com o isolado do Piauí, MK503848_GRSV_CL_N.

3 - Conforme o resultado obtido através das análises sorológicas e moleculares pode-se concluir que o GRSV está presente em campos de melancia do estado do Rio Grande do Norte, Mossoró e Ceará.

4 - Não foi possível detectar a presença de pseudorecombinação nas sequências dos segmentos de GRSV_RN analisados.

5 - Em relação aos resultados do estudo da gama de hospedeiros, as espécies *N. physalodes*; *C. annuum* (var. Sweet pepper yolo wonder); *S. lycopersicum* (var. Santa Clara e var. Santa Cruz); *P. florida* e *C. lanatus* (var. Crimson sweet, var. Charleston gray e var. Congo) foram suscetíveis ao GRSV por testes de Dot - ELISA. A espécie *N. benthamiana* é hospedeira de GRSV_RN. O resultado foi confirmado pela RT-PCR e via Dot-ELISA.