



Faculdade de Agronomia e Medicina veterinária

**Primeiro relato de watermelon crinkle leaf-associated virus 1
e watermelon crinkle leaf-associated virus 2 infectando
plantas de melancia (*Citrullus lanatus*) no Brasil.**

Matheus Hideki Kihara Maeda

Brasília, DF

Novembro de 2021

Matheus Hideki Kihara Maeda

**Primeiro relato de watermelon crinkle leaf-associated virus 1
e watermelon crinkle leaf-associated virus 2 infectando
plantas de melancia (*Citrullus lanatus*) no Brasil.**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB,
como parte das exigências do curso de Graduação em
Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Tatsuya Nagata

Brasília, DF

Novembro de 2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ATA DE AVALIAÇÃO – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Nome: Matheus Hideki Kihara Maeda

Título do Trabalho: Primeiro Relato de watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e watermelon crinkle leaf-associated virus 2 infectando plantas de melancia (*Citrullus lanatus*) no Brasil.

Aprovado em: Brasília, 5 de novembro de 2021.

|

Banca examinadora:

Tatsuya Nagata (Orientador)

José Ricardo Peixoto (Membro)

Pedro Ricardo Vieira Hamann (Membro)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS-----	iii
LISTA DE FIGURAS-----	iv
RESUMO-----	v
ABSTRACT-----	vi
1 INTRODUÇÃO-----	1
2 OBJETIVO-----	3
3 REVISÃO DE LITERATURA-----	4
3.1 Métodos de identificação de vírus em plantas -----	4
3.2 Relatos de WCLaV- 1 e -2 em melancia (<i>Citrullus lanatus</i>)-----	5
4 MATERIAIS E MÉTODOS-----	6
4.1 Coletas -----	6
4.2 Sequenciamento -----	6
4.3 Análise do sequenciamento-----	7
4.4 Confirmação por RT-PCR-----	8
4.5 Inoculação em casa de vegetação-----	10
5 RESULTADOS DISCUSSÃO-----	11
6 CONCLUSÃO-----	15
7 REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS-----	16

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Lista de primers utilizados para identificação dos vírus estudados.-----9

TABELA 2- Resultados obtidos na detecção de GRSV, WCLaV-1 e WCLaV-2.-----12

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação esquemática do fluxo de trabalho para sequenciamento de alto rendimento Illumina.-----	7
FIGURA 2- Representação esquemática do fluxo de trabalho de sequenciamento de alto rendimento voltado para análises de vírus de plantas.-----	8
FIGURA 3- Eletroforese de gel de agarose mostrando os <i>amplicons</i> de GRSV, WCLaV-1, WCLaV-2.-----	12
FIGURA 4- Plantas inoculadas mecanicamente com amostras de melancia direto do campo armazenadas no freezer -80 °C.-----	13
FIGURA 5 Eletroforese de gel de agarose de 2 plantas inoculadas mostrando os <i>amplicons</i> de GRSV, WCLaV-1, WCLaV-2.-----	15

RESUMO

Nesse trabalho, foi realizado o primeiro relato da ocorrência de watermelon crinkle leaf-associated virus -1 e watermelon crinkle leaf-associated virus 2 em território brasileiro. Utilizou-se a técnica de sequenciamento de alto rendimento (HTS) como principal ferramenta para a identificação dos vírus em amostras de plantas de melancia. Essas plantas apresentavam sintomas de clareamento das nervuras e deformação foliar e foram coletadas em campos de produção comercial de melancia em Guadalupe, Piauí, em 2015, na divisa entre Juazeiro e Curaçá, Bahia, em 2019, e no município de Mossoró, Rio grande do Norte, em 2020. Para a validação dos dados, foram feitas análises de RT-PCR de 12 amostras distribuídas entre os campos de Juazeiro e Mossoró. E após a confirmação da infecção do vírus nas amostras, foi realizado a inoculação mecânica, em casa de vegetação, de plantas de melancia a partir de tecido de plantas com sintomas de clareamento das nervuras e deformação foliar coletados em campos comerciais e armazenados em freezer -80°, que comprovaram a capacidade dos dois vírus de infectar plantas de melancia.

Palavras-Chave: Sequenciamento de alto desempenho, melancia, WCLaV-1 e WCLaV-2.

ABSTRACT

In this work, we report for the first time the occurrence of watermelon crinkle leaf-associated virus -1 and watermelon crinkle leaf-associated virus 2 in Brazil. The method of high throughput sequencing (HTS) was used as the main tool for virus identification in watermelon plant samples. The plants showed symptoms of vein clearing and leaf curling, and were collected in commercial watermelon fields in Guadalupe, Piauí, in 2015, on the border between Juazeiro and Curaçá, Bahia, in 2019, and in the county of Mossoró, Rio Grande do Norte, in 2020. For data validation, RT-PCR analyzes of 12 samples distributes between the Juazeiro and Mossoró fields were made. And after confirming the virus infection, a mechanical inoculation was performed in greenhouse environment; using tissue from watermelon plants with symptoms of vein clearing and leaf curling collected in commercial fields; confirming the ability of these two viruses to infect watermelon plants.

Keywords: High throughput sequencing, watermelon, WCLaV-1 and WCLaV-2.

1. INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus*) representa uma importante cultura dentro do agronegócio brasileiro, que apresenta grande demanda, tanto para exportação como para consumo interno. Com bons índices produtivos, a cultura foi classificada como a terceira maior dentro da fruticultura nacional, possuindo produção média com tetos produtivos de cerca de 22 toneladas de frutos por hectare plantado (IBGE, 2019).

A região Nordeste brasileira possui condições que favorecem o cultivo de culturas como a melancia e o melão (*Cucumis melo*). Porém, como em muitas outras culturas, a perda de produtividade é sempre correlacionada com adversidades no manejo cultural; em especial, com os inúmeros problemas de caráter fitossanitário, sendo uma delas as viroses. A compra e venda de produtos, proporciona o movimento de plantas, frutos e insetos vetores ao redor do planeta; aumentando a necessidade de métodos de identificação de patógenos práticos, confiáveis e com boa precisão. Visto isso devemos considerar a biossegurança no campo como uma parte importante do comércio interno e entre países; garantindo que não haja um movimento muito intenso de produtos infectados (Rondoni, 2009).

Com esse cenário, os produtores tomam medidas que implicam em grandes despesas para evitar ao máximo as doenças, preservando, portanto, a integridade das características dos frutos, garantindo seu valor na prateleira e no panorama industrial. Nos últimos anos, muitos relatos de identificações e caracterizações de vírus relacionados com a perda de produtividade, na melancia, vem sendo divulgados. O vírus do mosaico do pepino (CMV), o vírus da mancha anelar do mamoeiro (PRSV), o vírus do mosaico da melancia (WMV) e o vírus do mosaico da abobrinha (ZYMV) são alguns exemplos (Aguiar et al., 2014). Dessa forma, a disponibilização do máximo de informações é de extrema importância para o conhecimento dos agricultores; juntamente com os principais dados dos hospedeiros e sintomas. (Raimundo et al., 2013; Ootani, 2016).

A diagnose da doença é o primeiro e o mais importante passo para o manejo correto em campo. Para o reconhecimento rápido e acurado, técnicas sorológicas e moleculares, juntamente com a análise de microscopia eletrônica, foram desenvolvidas e vêm sendo melhoradas. Esses métodos podem ser usados, sozinhos ou em conjunto,

dependendo da necessidade e complexibilidade o projeto. Os métodos são de extrema importância para a identificação mais precisa e correta do patógeno, contribuindo para a obtenção de informações cada vez mais detalhadas do genoma e estrutura da partícula do vírus em questão. (Jeong et al., 2014; Baker et al., 1985)

Na perspectiva da virologia atual, além de técnicas laboratoriais para estudo de vírus, o sequenciamento de próxima geração (NGS- Next Generation Sequencing) ou sequenciamento de alto rendimento (HTS- High Throughput Sequencing) vem ajudando e favorecendo o descobrimento de muitos novos vírus em plantas, caracterizando-se, assim, uma “nova era” na virologia e em muitos outros ramos da ciência. Atualmente, as tecnologias de sequenciamento estão ficando cada vez mais acessíveis. Ao contrário de técnicas que envolvem o uso de primers específicos, anticorpos e químicos como o ácido fosfotúngstico (PTA), o sequenciamento de alto rendimento pode descrever o conteúdo de sequências virais dentro de uma única amostra ou um conjunto de amostras. Isso aumenta em uma grande escala a eficiência do processo de diagnose. Porém, há a necessidade de uma posterior confirmação e validação da identificação por técnicas moleculares ou sorológicas específicas (Blawid et al.,2016).

Levando esse contexto em consideração, o estudo e o acompanhamento dos vírus presentes no campo são de extrema importância para evitar epidemias e futuros problemas. Recentemente, uma nova virose com sintomas severos foi observada, sendo inicialmente diagnosticado como causado por groundnut ringspot virus (GRSV) (Leão et al. 2014). Entretanto, como a hipótese da possível presença de um outro vírus junto com GRSV, amostras de plantas de melancia com sintoma viral severo foram coletadas e analisadas utilizando a nova tecnologia HTS. O uso de HTS é uma ótima opção para monitorar e estudar o perfil de distribuição dos vírus, inclusive vírus emergentes em campos de produção comercial.

2. OBJETIVO

Nesse trabalho foi realizado o HTS e RT-PCR para detectar e identificar os vírus relatados e emergentes como watermelon crinkle-leaf associated virus 1 (WCLaV-1 e watermelon crinkle-leaf associated virus -2 (WCLaV-2) em amostras coletadas em campos comerciais voltados para a produção de melancia no Nordeste brasileiro.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Métodos de identificação de vírus em plantas

A detecção rápida de vírus é de extrema importância quando pensamos no controle efetivo dentro do campo comercial. Sintomas virais são difíceis de serem analisados e distinguir com aqueles causados por estresse abióticos ou por outros fatores presentes na lavoura. Com isso em mente, as metodologias são criadas e melhoradas com o tempo e não substituem um ao outro, garantindo um diagnóstico acurado para um controle efetivo. Todos são usados amplamente juntamente a estratégias para baratear e aumentar a eficiência da identificação.

Podemos separar os métodos de identificação pela sua área de estudo em que o protocolo foi criado e melhorado. Assim, temos os métodos sorológicos, que utilizam anticorpos específicos, produzidos em animais e por recombinação em sistemas tanto eucarióticos (leveduras, plantas, insetos etc.) como procarióticos (bactérias), contra um antígeno específico (proteínas estruturais do vírus) e são ferramentas que se adaptam bem à rotina em laboratório ou em campo. Dentre esses métodos reportados, se destacam o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), TBIA (Tissue blot immunoassay) e o QCMDI (Quartz Crystal microbalance immunosensors). Os métodos moleculares são eficientes e úteis somente quando alguma informação do genoma do vírus está disponível. Apesar de apresentar algumas limitações, é muito usado rotineiramente em laboratório por conta de sua sensibilidade e precisão, sendo o principal exemplo a PCR (reação em cadeia da polimerase) (Jeong et al., 2014).

Com o uso do HTS (especificado na Figura 1 e 2), muitos dados estão sendo gerados e estudados, provando ser uma ferramenta importante no processo de estudo da dinâmica, distribuição e diversidade das viroses na natureza. Com o avanço e popularização da tecnologia, protocolos mais acessíveis vêm sendo criados e compartilhados, diminuindo o custo total das análises; porém mesmo com essas melhorias, meios de validação dos dados como a PCR são importantes para a confirmação dos resultados (Blawid et al., 2016, M. Visser et al., 2016).

3.2. Relatos de WCLaV- 1 e -2 em melancia (*Citrullus lanatus*)

Como em outras culturas, o cultivo comercial de melancia sofre perdas consideráveis por conta de pragas que assolam a produção; e as viroses são uma delas. Relato de vírus como; o vírus do mosaico do pepino (CMV), o vírus da mancha anelar do mamoeiro (PRSV), o vírus do mosaico da melancia (WMV) e o vírus do mosaico da abobrinha (ZYMV) são alguns exemplos relatados em campos comerciais de melancia dentro ou fora do país. O watermelon crinkle leaf-associated virus 1 e watermelon crinkle leaf-associated virus 2 são vírus que foram reportados recentemente em campos comerciais causando sintomas de clareamento das nervuras e deformação foliar em plantas de melancia; e são supostos membros do gênero *Coguvirus* da família *Phenuiviridae* (Zhang et al. 2021). Sua organização genômica, ainda não clara, se dispõem de 2 segmentos de RNA (L, M) com 3 fases de leitura aberta mais evidentes; a RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), MV (Proteína de movimento) e NC (Nucleocapsídeo).

Relatos de WCLaV-1 e WCLaV -2 foram reportados por Xin e colaboradores em 2017, em plantas de melancia na província de Hénan, China, utilizando a plataforma Illumina HiSeq para identificação e estudo do vírus. Desde então, relatos de ocorrência do vírus estão sendo publicados. Hernandez e Hendricks juntamente com colaboradores (2021), utilizando HTS (Illumina NextSeq), realizaram o primeiro relato de WCLaV-1 e WCLaV-2 em plantas de melancia em campos comerciais de produção no Texas e Flórida, Estados Unidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coletas

As coletas foram realizadas em plantas de melancia de três locais e datas distintas: em Guadalupe, Piauí, em 15 de junho de 2015 (dados não apresentados), na divisa entre Juazeiro e Curaçá, Bahia, em 17 de maio de 2019, e no município de Mossoró, Rio grande do Norte em 2020. As amostras de Piauí coletadas em 2015 e de Mossoró em 2019 foram submetidas ao HTS para a detecção e identificação dos vírus presentes nas amostras.

4.2. Sequenciamento

Para o preparo das amostras, foi utilizado o protocolo de semi-purificação de partícula viral. Após a seleção das amostras dos campos, cerca de 40 gramas do material foliar com a mistura de 10 plantas de melancia do mesmo campo (pool) foram pulverizados em contato direto com nitrogênio líquido. Logo após, foi adicionado 350 ml de tampão de extração (pH8,0, EDTA 1 mM, tampão fosfato de sódio a 0,1 M e 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol). Com a amostra homogeneizada, a mistura foi filtrada utilizando-se gaze de linho, transferido para tubos de centrífuga de 50 ml e centrifugados a $3900 \times g$ por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos com colchão de sacarose a 20% e centrifugado a $140000 \times g$ em um período de 1 hora. O precipitado de semi-purificação foi submetido à extração de RNA utilizando o kit RNeasy® Minikit (Qiagen), conforme recomendações do fabricante.

O cDNA preparado com kits específicos (TruSeq Stranded Total RNA; Ribo-Zero plant Kit - Illumina, San Diego, EUA) foi submetido a HTS na plataforma Illumina Novaseq (Macrogen, Seoul, Coréia do sul).

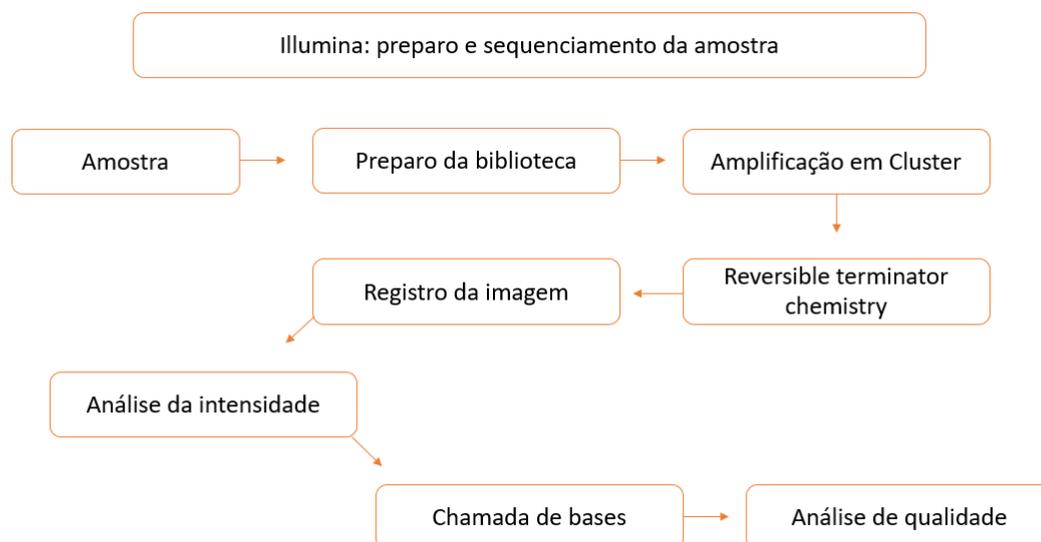


FIGURA 1- Representação esquemática do fluxo de trabalho para sequenciamento de alto rendimento Illumina (Adaptado de Kircher et al., 2011).

4.3. Análise do sequenciamento

Os dados do sequenciamento foram submetidos a tratamento de qualidade com FastQC (Andrews S, 2010). Os reads com baixa qualidade e os adaptadores foram removidos utilizando o BBduk (Bushnell e Brian, 2014) e o *De novo* assembly foi realizado com o Megahit (Li et al., 2015). Após esses tratamentos, os contigs foram transferidos para a plataforma Geneious 11.1 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia) e foram submetidos à análise tBlastX contra sequências virais do banco de dados de referência (RefSeq) disponibilizados e atualizados pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information, EUA). Em seguida, com os resultados do tBlastX, os dados foram submetidos a análises de mapeamento dos reads com referências específicas para a montagem de genomas virais completos. Com isso, nos dados gerados com o sequenciamento, além de groundnut ringspot virus (GRSV), foram observadas e identificadas a presença de watermelon crinkle leaf-associated virus-1 (WCLaV-1, 27 LC636070-72) e -2 (WCLaV-2, LC636073-75) que são membros do gênero *Coguvirus* da família *Phenuiviridae* (Zhang et al. 2021).

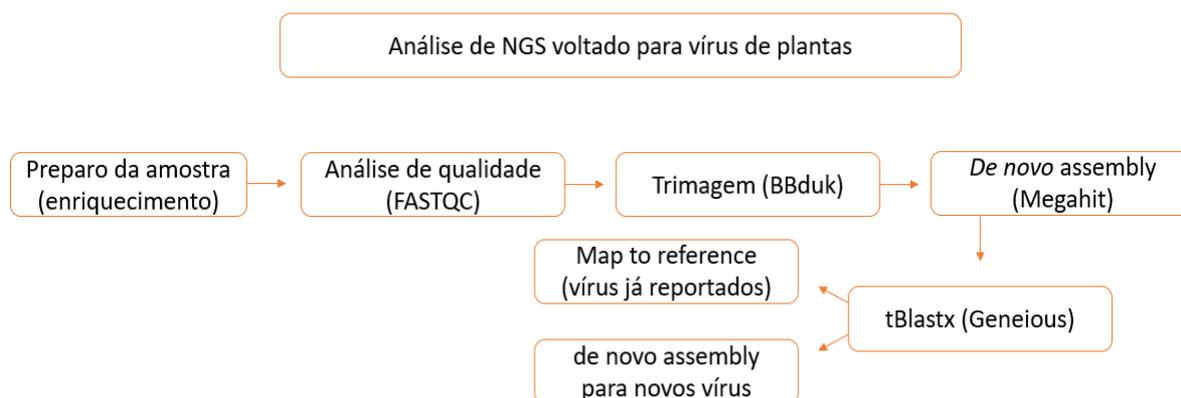


FIGURA 2- Representação esquemática do fluxo de trabalho de sequenciamento de alto rendimento.

4.4. Confirmação por RT-PCR

Após a análise do sequenciamento, as amostras, recebidas de campos tanto de Mossoró como de Juazeiro, foram separadas em pequenos conjuntos de 50 g e estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, juntamente com uma planta sadia de melancia (cultivar crimson Sweet) para controle negativo. E em seguida, extrações de RNA foram realizadas utilizando PureLink™ Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) de acordo com as orientações do fabricante. A reação para a obtenção do cDNA foi realizada utilizando primers randômicos (Random hexamers) e a enzima MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, RS, Brasil). Cerca de $6\text{ }\mu\text{L}$ do RNA extraído foi adicionado a uma reação com $1\text{ }\mu\text{L}$ de primer randômico, $1\text{ }\mu\text{L}$ de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP) a 10mM e $6\text{ }\mu\text{L}$ de água para PCR e a mistura foi submetida a incubação a uma temperatura de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e no gelo por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado $4\text{ }\mu\text{L}$ de tampão da reação e $1\text{ }\mu\text{L}$ de RNasin, incubando por $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 10 minutos; e por fim, adicionando $1\text{ }\mu\text{L}$ da enzima MMLV e incubando o total de $20\text{ }\mu\text{L}$ de reação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 minutos e a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min.

Após sintetizado, o cDNA foi submetido a uma reação de cadeia polimerase (PCR) utilizando primers específicos (Tabela 1) desenhados para identificar a presença de GRSV, WCLaV-1 e WCLaV-2; utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Para a reação, foram utilizados 2 µL do tampão 10x PCR (Mg²⁺ plus), 0,5 µL de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP) a 10 mM de concentração, 1 µL de cada primer, 14,5 µL de água para PCR e 1 µL do cDNA. No termociclador, a reação foi submetida a um hotstart de 80 °C por 1 minuto, seguido de 94 °C por 2 minutos, e 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 53 °C por 1 minuto (para primers de GRSV e WCLaV-1) ou 50 °C (para primers de WCLaV-2) e 72 °C por 1 minuto; seguido de um período de extensão final de 6 minutos a 72 °C após a finalização dos ciclos. O resultado da amplificação foi avaliado por eletroforese de gel de agarose a 1% (m/v%).

TABELA 1- Lista de primers utilizados para identificação dos vírus estudados (Hernandez et al., 2021).

Vírus	Primers	Sequência
WCLaV-1	WCLaV-1cMP	GACTGTGGCTGAAGAGTCTATG
	WCLaV-1vNP	CGAATAGACTCTGGAGGGTAGA
	WCLaV1S	ACCCTCAACATCTGGTTTCT
	WCLaV1A	GTAGTGGACGAGGGATGAA
WCLaV-2	WCLaV-2vNP	ATTCCCAGTGAGAGCAACAA
	WCLaV-2cMP	CAAGGGAGAGTGCTGACAAA
	WCLaV2S	CAGCTGAATTGAACTCATCTT
	WCLaV2A	CAAGGTACAGAGTAGAGCTTT
GRSV	GRSVS	GTGCATCATCCATTGTAAATCC
	GRSVA	CGCCAAAGCATCATGAAAG

4.5. Inoculação em casa de vegetação.

Amostras de plantas confirmadas para a detecção de GRSV, WCLaV-1 e 2 ou somente para GRSV e WCLaV-1 foram inoculados em plantas de melancia (cultivar crimson Sweet), no início do estágio vegetativo (primeira folha verdadeira evidente), em 3 repetições. Para as inoculações, foi utilizado o extrato de folhas (obtidas diretamente do freezer -80 °C) em tampão fosfato de sódio a 0,05 M, pH 7,0. As plantas foram polvilhadas antes da inoculação com o abrasivo Carborundum 600 mesh, para a formação de micro ferimentos para que permitem a entrada do material de forma mais eficiente. O controle foi inoculado somente o tampão. Em seguida, as plantas foram lavadas com água corrente. As avaliações foram feitas de forma semanal em um período de 30 dias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após todas as análises de HTS da amostra de Mossoró (de 2019) e tratamento de dados, foi observada uma cobertura dos reads compatíveis com WCLaV-1 e WCLaV-2 de 1652 a 2532 com os genes RdRp, nucleocapsídeo (NC) e proteína de movimento putativo (pMP) e 404 a 1025 (RdRp, NC e pMP), respectivamente. A identidade entre os genes das sequências consenso obtidas e a referência de WCLaV-1 KF-15 isolado na China (KY781184-86) foi de 99% na RdRp, 98,9% no NC e 99,1% na pMP; e para o WCLaV-2 KF-15 isolado na China (MW559083-91) foi de 97,2% na RdRp, 96,6% no NC e 96,9% na pMP.

Com a detecção dos vírus nas amostras enviadas para sequenciamento de alto desempenho, os primers GRSVS, GRSVA, WCLaV1S, WCLaV1A, WCLaV2S e WCLaV2A, especificados na TABELA1 foram utilizados para a avaliação da presença de GRSV, WCLaV-1 e WCLaV-2 com tamanhos esperados de 445, 296 e 392bp respectivamente. em cada planta individual. Das 12 amostras analisadas (6 de Mossoró/RN e 6 de Juazeiro/BA), somente uma (FIGURA 3, amostra M2), do campo de Mossoró, não apresentou *amplicon* para nenhum dos 3 vírus; e dentro dessas, uma de cada campo, apresentou resultado positivo para WCLaV-2, WCLaV-1 e GRSV (M4 e J9). As outras amostras (9 plantas de 12) foram positivas para WCLaV-1 e GRSV.

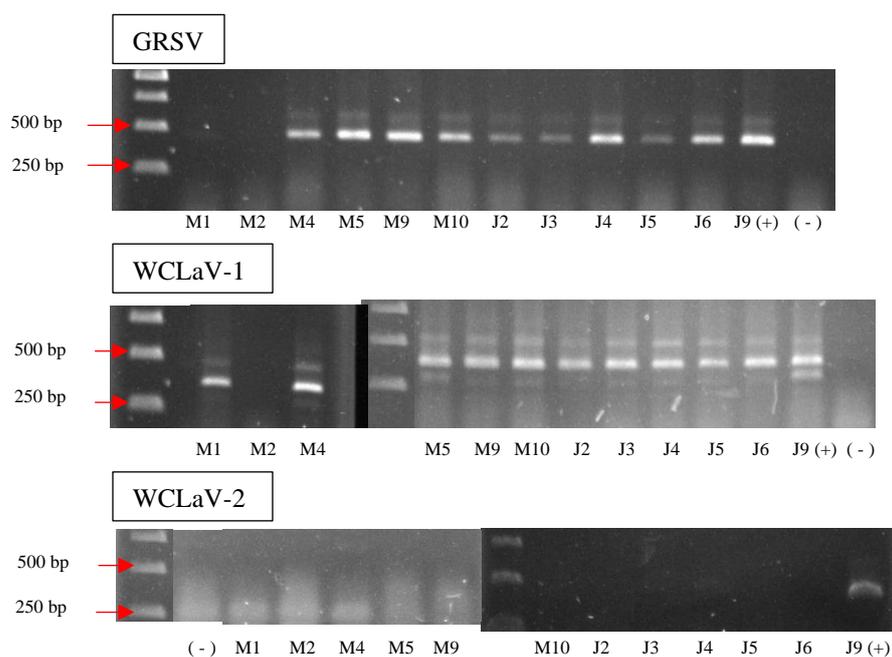


FIGURA 3 – Eletroforese de gel de agarose mostrando os *amplicons* de GRSV, WCLaV-1, WCLaV-2 utilizando os primers especificados na TABELA 2. As amostras são de plantas coletadas nos campos de Mossoró (M) e Juazeiro (J). Para o controle positivo foi utilizado a amostra J9, que apresentava resultado positivo para todos os vírus e foi analisada anteriormente pela mesma metodologia.

TABELA 2- Resultados obtidos na detecção de GRSV, WCLaV-1 e WCLaV-2 com os pares de primers especificados na TABELA1, para amostras de melancia coletadas nos campos de Mossoró (M) e Juazeiro (J).

Amostra	GRSV	WCLaV- 1	WCLaV- 2
M1	+	+	-
M2	-	-	-
M4	+	+	+
M5	+	+	-
M9	+	+	-
M10	+	+	-
J2	+	+	-
J3	+	+	-
J4	+	+	-
J5	+	+	-
J6	+	+	-
J9 (+)	+	+	+
(-)	-	-	-

Logo após a confirmação, foi realizado testes por inoculação mecânica e a posterior avaliação semanal dos sintomas. Nas plantas infectadas, os sintomas de deformação do topo, típico de sintoma “crinkle” foram observados, entretanto com tempo os sintomas ficaram leves. Por RT-PCR, foi confirmada a infecção em 8 plantas de um total de 18, porém, nenhuma foi positiva para GRSV. Dentro dessas, 7 plantas foram infectadas somente com WCLaV-1, enquanto somente 1 apresentou ambos os vírus (WCLaV-1 e WCLaV-2). As plantas infectadas apresentavam sintomas de enrolamento e deformação foliar, como indicado na FIGURA 4, dentro do período avaliado de 30 dias. Com isso, temos a hipótese que o vírus WCLaV-1, associado ou não com WCLaV-2, induz sintomas leves em plantas infectadas de melancia. Acreditamos que o forte sintoma apresentado em amostras coletadas em campo comercial de distorção e enrolamento foliar é relacionado com uma interação adicional em plantas com infecção de GRSV.



FIGURA 4 - Plantas inoculadas mecanicamente com amostras de melancia direto do campo armazenadas no freezer -80 °C. As setas indicam sintomas de deformação foliar observados em folhas novas, no topo da planta.

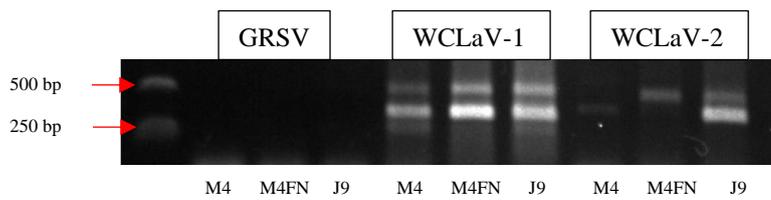


FIGURA 5 - Eletroforese de gel de agarose de 2 plantas inoculadas mostrando os *amplicons* de GRSV, WCLaV-1, WCLaV-2 utilizando os primers: GRSVA e GRSVS, WCLaV1S e WCLaV1A, WCLaV2S e WCLaV2A; especificados na TABELA 1, com tamanhos esperados de 445, 296 e 392bp respectivamente; de plantas inoculadas, tanto das folhas velhas (no final de 30 dias após a primeira folha verdadeira) como das folhas novas (5-10 dias após a primeira folha verdadeira) (FN).

Adicionalmente, uma análise de HTS conduzido na Universidade da California Davis com amostras de melancia com sintomas de clareamento das nervuras e deformação foliar coletados em campos de Guadalupe, Piauí, em junho de 2015 (dados não apresentados). A presença de WCLaV-1 (LC636068-9) e uma cepa divergente de GRSV foi confirmada no experimento, sem apresentar nenhum indício de WCLaV-2. A identidade em nível de nucleotídeo dos consensos dos isolados de WCLaV-1 dos campos de Piauí e Juazeiro foram de 99,9% para a RdRp e NC e 100% para pMP. Esses resultados reforçam a hipótese que WCLaV-1 e WCLaV-2 estão presentes em frequente associação com vários vírus causadores de sintomas em campos de produção de melancia no Brasil.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se nesse trabalho o primeiro relato de WCLaV-1 e WCLaV-2, por análises de HTS, coletados no Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte. Estudos adicionais são necessários para a caracterização biológica e molecular dos vírus. O ciclo de hospedeiros, a caracterização do vetor de transmissão e a determinação da estrutura e organização do genoma são pontos a serem considerados e explorados em trabalhos futuros.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E, Navalinskiene M, Samuitiene M, Boonham N. Next generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol Plant Pathol.*, 2009.

Aguiar, R., Caeser, A., Portella, F., Lopes, M., Lima, M., & Resende, R.O., Nagata, T., Rodrigues, A.. Serological Identification of Virus in Watermelon Production Fields in the Tocantins State. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2014.

Aguiar, R. W. de S., Evangelista, M. P., Ramos, A. C. C., Pascoal, P. V., Barros, H. B., & dos Santos, M. M. Danos e sintomatologia de vírus associado à cultura da melancia no estado do Tocantins. *Bioscience Journal*, 29. 2013.

Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>)

Blawid, R., Silva, J. and Nagata, T. Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline. *Ann Appl Biol*, 170: 301-314, 2016.

Bushnell, Brian. BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner. United States: N. p., 2014.

Dinghua Li, Chi-Man Liu, Ruibang Luo, Kunihiko Sadakane, Tak-Wah Lam. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct *de Bruijn* graph, *Bioinformatics*, Volume 31, Issue 10, 15 May 2015, Pages 1674–1676.

Hendricks K, Hernandez RN, Roberts P, Isakeit T, Alabi OJ. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 (WCLaV-1) and WCLaV-2 in watermelon (*Citrullus lanatus* L.) plants co-infected with *Cucurbit chlorotic yellows virus* in Florida. *Plant Dis*, 2021.

Hernandez RN, Isakeit T, Al Rwahnih M, Villegas C, Alabi OJ. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 (WCLaV-1) and WCLaV-2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) in the United States. *Plant Dis*, 2021.

Jeong, J. -J, Ju, H.-J., & Noh, J. A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease*, 2014.

Karen K. Baker, Michigan State University, East Lansing. Donald C. Ramsdell, and Jerri M. Gillett. *Electron Microscopy: Current Applications to Plant Virology*. APS Journals, 1985.

Kircher, M., Heyn, P. & Kelso, J. Addressing challenges in the production and analysis of illumina sequencing data. *BMC Genomics*, 2011.

Leão, E. U., Spadotti, D., Rocha, K.C.G., Pantoja, K. F. C., Rezende, J.A.M., Pavan, M.A., Krause-Sakate, R. *Citrullus lanatus* is a new natural host of Groundnut ringspot virus in Brazil. *Journal of Phytopathology*, v. 163, n. 11-12, p. 1014-1018, 2015.

Maeda MHK, Koyama LHH, Campos RNS, Kauffmann CM, Osse de Souza J, Gilbertson R, Inoue-Nagata A, Freitas DMS, Nogueira DRS, Melo FL, Nagata T. First report of watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and 2 infecting watermelon (*Citrullus lanatus*) plants in Brazil. *Plant Dis*, 2021.

Ootani, M. A., Maciel, P. G. d. S., Brito, D. R., Aguiar, R. W. d. s., Naoe, A. M. d. l., & Lopes, L. A. Caracterização sintomatológica de vírus de melancia isolados do estado do Tocantins. *Agric-Environmental Sciences*, 2006.

Rodoni B. The role of plant biosecurity in preventing and controlling emerging plant virus disease epidemics. *Virus Res*. 2009

Shrefler, J., Brandenberger, L., Rebek, E., Demicone, J., Taylor, M. Watermelon Production. Oklahoma Cooperative Extension, 2015.

Villamor DEV, Ho T, Al Rwahnih M, Martin RR, Tzanetakis IE. High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery. *Phytopathology*, 2019.

Visser M, Bester R, Burger JT, Maree HJ. Next generation sequencing for virus detection: covering all the bases. *Virology*. 2016.

Xin M, Cao M, Liu W, Ren Y, Zhou X, Wang X. Two Negative-Strand RNA Viruses Identified in Watermelon Represent a Novel Clade in the Order Bunyavirales. *Front Microbiol*, 2017.

Zhang, Song & Tian, Xin & Navarro, Beatriz & Di Serio, Francesco & Cao, Mengji. Watermelon crinkle leaf-associated virus 1 and watermelon crinkle leaf-associated virus 2 have a bipartite genome with molecular signatures typical of the members of the genus *Coguvirus* (family *Phenuiviridae*). *Archives of Virology*, 2021.