

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MITOVIRUS ASSOCIADOS A MARACUJAZEIROS (*Passiflora* spp).

YAM DE SOUSA SANTOS

ORIENTADORA: Dr^a SIMONE DA GRAÇA RIBEIRO

CO-ORIENTADORA: Drª MAGNÓLIA DE ARAÚJO CAMPOS

CUITÉ - PB 2021

YAM DE SOUSA SANTOS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MITOVIRUS ASSOCIADOS A MARACUJAZEIROS (*Passiflora* Spp).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Dr^a Simone da Graça Ribeiro Co-orientadora: Prof^a Dr^a Magnólia de Araújo Campos

> CUITÉ – PB 2021

S237c Santos, Yam de Sousa.

Caracterização molecular de mitovirus associados a maracujazeiros (*Passiflora spp*). / Yam de Sousa Santos. - Cuité, 2021.

77 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) -Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2021.

"Orientação: Profa. Dra. Simone da Graça Ribeiro; Coorientadora: Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos".

Referências.

1. Maracujá. 2. Maracujazeiro. 3. Mitovirus. 4. Passiflora. 5. Genes transferência horizontal. 6. Mitovirus - caracterização molecular. I. Ribeiro, Simone da Graça. II. Campos, Magnólia de Araújo. III. Título. CDU 634.776.3(043)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO BIBLIOTECÁRIO Msc. Jesiel Ferreira Gomes - CRB-15/256

"CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MITOVÍRUS ASSOCIADOS A MARACUJAZEIROS (Passiflora spp)"

YAM DE SOUSA SANTOS

Dissertação Aprovada em 02/08/2021pelaBanca Examinadora constituída dos seguintes

membros:

Simone Rhi

Dra. Simone da Graça Ribeiro Orientadora EMBRAPA

Mampers

Dra. Magnólia de Araújo CamposPfenning Coorientadora UABQ/CES/UFCG

Spara aliveria acima-

Dra. Igara Oliveira Lima Examinadora Interna UAS/CES/UFCG

ruas

Dra. Poliáne Alfenas-Zerbini Examinadora Externa UFV

"Omnia mea mecum porto"

Do latim, "Carrego comigo, tudo aquilo que tenho. — Filósofo Bias, Grécia.

À minha querida amiga Elvira Texeira que, embora não mais presente neste plano físico, sempre estará sorrindo em minhas lembranças;

A todos aqueles que perderam alguém querido,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES, CNPq, UFCG, e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) pelo apoio financeiro à pesquisa.

Ao PPGCNBiotec pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoalacadêmico e ao Cenargen, por ter cedido o espaço e Laboratório de Interação Plantas-Pragas III (LPP3) para execução deste trabalho.

A minha orientadora Dr^a. Simone Ribeiro, não somente pelo conhecimento partilhado, mas pela amizade, confiança e apoio incondicional durante este tempo. Um exemplo enquanto pessoa e profissional. Serei eternamente grato pela oportunidade de ter te conhecido.

A minha coorientadora Dr^a. Magnólia Campos, que nunca mediu esforços para me ajudar quando precisei. Obrigado pelos conselhos, risadas e cafezinhos.

Aos pesquisadores Dr. Fernando Lucas Melo (UnB) e Dr. Cristiano Lacorte (Embrapa Cenargen) pelos conhecimentos partilhados, dicas, sugestões e por toda a ajuda durante a pesquisa.

Ao Dr. Fabio Gelape Faleiro por permitir e auxiliar as coletas de amostras no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) "Flor da Paixão".

À professora Dr^a. Igara Oliveira de Lima, que além de uma excelente professora, soube dar apoio moral e suporte emocional durante minha estadia em Cuité. Obrigado também por aceitar participar da banca de avaliação.

À professora Dr^a. Poliane Alfenas Zerbini por disponibilizar-se a participar da defesa e pelas contribuições neste trabalho.

Ao Dr. Cristiano Lacorte (Cenargen) e ao Dr. Wylly Araújo de Oliveira (UFCG) por se disponibilizarem a participar como suplentes na composição da banca de avaliação deste trabalho.

À Dr^a Andrea Pedrosa-Harand (UFPE) e a Mariela A. Sader (UFPE) que contribuíram com o nosso trabalho ao disponibilizarem dados de sua pesquisa para a construção de parte dos nossos resultados.

A todos os meus amigos que fiz na UFCG-CFP e jamais desapeguei, Luziana, Marina, Aclébia, Esteffane, Laércio, Alessandro, Letícia, Will, Giselle e principalmente a Cristina Novikoff, grande guru espiritual que sempre estará em meu coração. Aos meus amigos do "Bloquinho Shineray" (Ronier, Eliamary, Suzy, Maiane, Winnie, Tereza e Jéssica). Jamais imaginaria que um bloquinho de carnaval se tornaria um grupo tão importante de acolhimento, suporte a amor.

Aos meus amigos de infância, Samara e Joaquim, que nunca me abandonaram, independente dos caminhos que decidimos trilhar. Todas as risadas, segredos e sucessos que adquirimos e compartilhamos ao longo da vida são fonte de energia para que eu continue a crescer.

À minha "web-amiga", Natália Prudência Viana, que mesmo que não tenhamos tido a oportunidade de se encontrar pessoalmente ainda, sempre esteve por perto. Obrigado pela amizade, ensinamentos científicos e vídeos de calopsita.

A todos os amigos que conheci ao longo desta jornada Cuité-Brasília, especialmente à Amélia Ruth, Tereza Lucena, Rodrigo Ribeiro, Mikael, Higor Henrique, Amanda Costa, Edson Pontes, Whu Guimarães, Christian Pessoa, Valquirio Junior, Tatiana Valadares, Ana Letícia, Carol, Gabriel (Ravi), Edson Junior, Vitor Hugo e Phelip Vieira. Conhecê-los durante esta etapa tão importante da minha vida foi crucial para que eu tivesse a certeza de que estava no caminho certo. Obrigado a todos pelo cuidado e carinho que tiveram e ainda tem comigo.

À Ivania Samara pela companhia em Cuité, receitas compartilhas, karaokês cantados e todo o cuidado que você tem comigo.

Ao Luiz Gustavo pela companhia, amizade e tantos momentos bons em Brasília. Você foi uma luz durante esta época tão complicada e caótica.

A todos que compõem ou que já fizeram parte do LPP3, tanto do grupo "arachis" (Andressa, Pedro, Matheus, Renan, Ana Zotta, Elisa, Thaís, Amanda, Deziany e Bruna Medeiros) como da "virologia" (Bruna Pinheiro, Andreza, Gustavo, Marlonni, Monique, Clara, Rafael e Monalisa), além do analista Mário Saraiva. Só vocês conseguem deixar um ambiente tão confortável e animado, mesmo nos dias de desespero.

À Andreza Vidal por ter me acolhido assim que cheguei em Brasília, pelos cafezinhos na Embrapa, piqueniques e "ioga-time" aos domingos no eixão.

Aos meus pais, Maria Elizabeth (Preta) e Isidro, que embora não compreendam direito todas as decisões que tomei, me ensinaram que a vida não se vive sozinho.

Esta jornada não seria possível sem a ajuda de tantas pessoas e por isso, agradeço a todas que depositaram o mínimo de esperança que ainda faltava em mim.

A todos, muito obrigado!

ABREVIATURAS E SIGLAS11
LISTA DE TABELAS
LISTA DE FIGURAS13
RESUMO16
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO18
2. OBJETIVOS
2.1. Objetivo geral
2.2. Objetivos específicos19
3. ESTUDO DA ARTE/ESTADO DO CONHECIMENTO
3.1. O Maracujazeiro
3.2. <i>Mitoviridae:</i> uma nova família de vírus21
3.3. <i>Mitovirus</i>
3.4. Elementos virais de RNA não-retroviral endogenizados24
4. MATERIAIS E MÉTODOS
4.1. Extração de Ácidos Nucleicos27
4.2. Recuperação dos genomas virais, clonagem molecular e sequenciamento28
4.2.1. Desenho dos primers
4.2.2. Síntese de cDNA (DNA complementar) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)
4.3. Clonagem do produto de PCR e sequenciamento
4.4. Dot blot
4.5. Análises filogenéticas
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO
5.1. Evidências de mitovirus em Maracujazeiros (<i>Passiflora spp.</i>)33
5.1.1. Análise do HTS de dsRNA de amostras de folhas de <i>Passiflora</i> spp e montagem de sequências de mitovirus-like
5.2. Caracterização de mitovírus em acessos de <i>Passiflora spp.</i> como elementos endogenizados de RNA-não-retroviral
5.2.1. Obtenção dos genes de RdRp mitovirais (PMV1 e PMV2) completos44
5.2.2. Aspectos co-evolutivos de passiflora mitovirus-like e espécies de Passiflora 49
5.3. Detecção e caracterização molecular de passiflora mitovirus-like 3 em amostras do campo e do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) – Flor da paixão

SUMÁRIO

6.	CONCLUSÕES56			
REFERÊNCIAS				
AP	ÊNDICES64			
I. apro	Pools de <i>Passiflora spp</i> . identificados por acesso, espécie e sintomas esentados durante a coleta64			
II. Ger	Sequências utilizadas para análises filogenéticas e seus números de acesso no nBank			
III. <i>syb</i> Bag = R utili	Controle de DNase: Eletroforese em Gel de agarose (1%, corado com persafe) dos fragmentos obitidos por meio PCR utilizando combinação de primers g3_Mito2-2_379F + Bag3_Mito2-2_1076R. RT = transcripatase reversa. RNA – RT NA sem realizar reação de transcriptase reversa. Para o controle positivo (C+) foi zado DNA total de amostra sabiamente positiva			
ANI	EXOS73			
I.	Protocolo de preparo de Meio Luria-Bertani (LB)73			
II.	Soluções para Miniprep73			
III.	Tampão CTAB74			
IV.	Solução TE74			
V. de '	Resumo publicado nos Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro Virologia do Mercosul (2020)75			
VI. gra e B	Resumo premiado com título de menção honrosa na categoria "vegetal – pós duação" no XXV Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos iotecnologia (2020)			

ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – Aminoácidos

- Atmv Arabidopsis thaliana mitovirus
- BAG Banco ativo de germoplasma
- BvMv1 Beta vulgaris mitovirus 1
- cDNA DNA complementar
- CqMv1 Chenopodium quinoa mitovirus 1
- DNA Ácido desoxirribonucleico

dsRNA – RNA de fita dupla

- ERVs Elementos endogenizados derivados de retrovírus
- HTS Sequenciamento de alto desempenho

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

mtDNA - DNA mitocondrial

Mv – Mitovírus

MvNERVE - Elementos de RNA-não retroviral endogenizados oriundos de

sequências mitovirais

- NERVE Elementos de RNA-não retroviral endogenizados
- nt Nucleotídeos
- ORF Fase aberta de leitura
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- PF Primer forward
- PMBA Pool de dsRNA de Maracujás da Bahia
- PMV Passiflora mitovirus-like
- **PR** Primer reverse
- RdRp RNA Polimerase dependente de RNA
- RNA Ácido ribonucleico
- RT-PCR Transcrição reversa seguida de reação em cadeira da polimerase
- siRNA Pequenos RNAs interferentes
- ssRNA+ RNA de fita simples de senso positivo
- UTR Região terminal não transcrita

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Primers utilizados para reações de PCR e RT-PCR para PMV1, PMV2 e PMV3 nos pools de RNA de amostras do BAG (BAG 1 – 3) e da Bahia (PM1BA e Tabela 2. Características moleculares das sequências preditas de mitovirus-like, associadas a maracujazeiros, montadas a partir dos dados de HTS. Predição de estrutura secundárias nas regiões 5'-UTR e 3'-UTR bem como resultados do blastx Tabela 3. Caracterização das ORFs de PMV1 endogenizadas em maracujazeiros ferramenta utilizando а smartblast embutida no programa orffinder

LISTA DE FIGURAS

Figura 5. Análise filogenética inferida com o método máxima verossimilhança (ML) utilizando as sequências de aminoácidos preditas RdRp (número de acesso ao GenBank no anexo X) de representantes da família Mitoviridae, Narnaviridae e, como grupo externo, representantes da família Leviviridae. A família Mitoviridae se organiza em três clados conforme descrito anteriormente por Nibert e colaboradores (2018). Sequências de mitovírus associados a plantas compõem um grupo monofilético juntamente com as sequências de passiflora mitovirus-like (PMV) destacadas em vermelho. Os valores de suporte dos clados são descritos ao lado de cada um......38

Figura 6. Quantidade de A+U (%) entre os genomas de passiflora mitovirus-like (PMV).

Figura 7. Detecção de PMV1 em acessos de maracujazeiro do BAG por PCR. **A.** Representação esquemática de PMV1; primers utilizados para detecção nas amostras individuais são indicados em setas verdes; **Primer Foward (PF) =** Bag3_Mito1-1_641F e **Primer Reverse (PR) =** Bag3_Mito1-2_2300R (tabela 1). **B.** Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com sybersafe) fragmentos obtidos por PCR a partir do DNA genômico de diferentes espécies e cultivares de maracujazeiros. Marcador: 1 Star kb ladder Cellco......40

Figura 8. Detecção de PMV2 em acessos de maracujazeiro do BAG por PCR e RT-PCR. **A** Esquema da organização genômica predita de PMV2 contendo em torno de 5505pb. Contig original destacado na seta dupla, abaixo estão os primers utilizados para detecção nas amostras individuais indicados em setas verdes; **Primer Foward** (**PF**) = Bag3_Mito2-2_379F e **Primer Reverse (PR)** = Bag3_Mito2-2_1076R (tabela 1). Fase de leitura aberta recuperada destacada em cinza. Triângulos acima da ORF destacam inserções realizadas para recuperação o frame. **B.** Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com sybersafe) dos fragmentos amplificados a partir do RNA total e do DNA genômico de diferentes espécies de maracujazeiros do pool BAG 3. Marcador 1kb plus **C.** Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com sybersafe) dos fragmentos amplificados a partir do DNA genômico de diferentes espécies de maracujá referentes aos pools BAG 1 e 2. Marcador 1 Star kb ladder Cellco.42

Figura 11. Características moleculares de PMV1. **A.** Representação esquemática da organização genômica da sequência de PMV1 amplificadas a partir do DNA genômico de amostras de maracujazeiros e sequenciadas por método Sanger. **B.** Mutações ao longo do genoma de PMV1. Alinhamento das sequências de PMV1 amplificadas a partir de amostras de maracujazeiros e sequenciadas por método Sanger juntamente com sequência obtida do HTS. Destaques em laranja apontam mutações (substituição ou deleção de bases) locais. Identidade entre sequências é mostrado em barra verde. ORFs anotadas em rosa.

Figura 16. Detecção de PMV3 nas amostras do campo coletadas naBahia e amostras do BAG – Flor da Paixão por meio de dot blotting. **A.** Membrana contendo amostras dos de RNA total das amostras que compõe os pools PM1BA e PM2BA referente as amostras coletadas na Bahia – BA. Controle positivo (C+) descrito nos materiais e métodos **B.** membrana contendo amostras coletadas no BAG – Flor da Paixão. **C.** Eletrofrese em gel de agarose (1%, corado com sybersafe, marcador 1 star kb ladder Cellco) de produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico das amostras positivas no dot blotting utilizando a combinação de primers Mito331F + MitoB4331299R. Para controle positivo (C+) foi utilizado o produto de PCR purificado utilizado como sonda para dot blotting. Amostras referentes à numeração na membrana descritas nos apêndices.

RESUMO

O maracujazeiro (Passiflora sp), pertence à família Passifloracea e possui grande importância econômica. Sua produção pode ser afetada por uma grande variedade de doenças causadas por vírus. O gênero Mitovirus, da família Mitoviridae, compreende vírus de ssRNA não encapsidados caracterizados por possuírem uma única ORF capaz de codificar uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) e por localizarse no interior de mitocôndrias de fungos. Entretanto, vírus deste gênero também tem sido identificados em plantas como elementos endogenizados de RNA-não-retroviral, embora não possuam estágio obrigatório de DNA, tampouco uma transcriptase reversa em seu genoma. Até o presente momento, não há estudos relacionados a infecções causadas por mitovírus em maracujazeiros. Desta forma o objetivo deste estudo foi identificar mitovírus em acessos de Passiflora spp. através de técnicas moleculares. RNAs de dupla fita (dsRNA) extraídos de acessos de Passiflora spp. do "BAG Flor da Paixão" e de amostras do campo coletadas na Bahia - BA foram sequenciados em plataforma Illumina HiSeg 2500. Foram montados 162 contigs com alta similaridade com outros mitovirus de plantas a partir dos reads obtidos no sequenciamento. Seis sequências de senso positivo contendo entre 2.3 - 5,5kb foram obtidas e nomeadas de PMV1 a PMV6. Primers foram sintetizados para PCR e RT-PCR para as seguências PMV1, 2 E 3. Reações de RT-PCR e PCR foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose e bandas de tamanho esperado foram cortadas, purificadas, clonadas e sequenciadas. As sequências de PMV1 e PMV2 foram caracterizadas como elementos endogenizados capazes de serem transcritos. Em contrapartida, PMV3 aparentemente não é um elemento endogenizado estando associado a diferentes espécies de Passiflora. Em suma, aqui apresentamos a primeira evidência de infecção por mitovirus em Passiflora spp. como elemento endogenizados e a detecção destes fragmentos em amostras de RNA indicam que PMV é transcrito pela planta.

Palavras-chave: Transferência Horizontal de genes, *Mitoviridae*, Sequenciamento de alto desempenho.

ABSTRACT

Mitoviruses consist of a group of ssRNA (+) viruses with a single ORF encoding a viral RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp) protein and have no capsid. These viruses belong to the Mitoviridae family, infect mitochondria of phytopathogenic fungi, and were recently detected infecting plants. Although a DNA stage in the replication cycle or genome integration is not required, mitovirus-derived sequences can be detected in host mitochondrial and nuclear genomes of plants. In some cases, these mitovirusderived sequences are capable of being transcribed. Passion fruit (Passiflora spp.) is an economically important crop for many tropical and sub-tropical countries worldwide, and its production is affected by many diseases caused by viruses. However, there are no reports of mitoviruses associated with Passiflora spp. This study aimed to identify mitoviruses associated with passionflower plants by molecular techniques. Doublestrand RNA (dsRNA) extracted from accessions of Passiflora spp. plants with virus-like symptoms was sequenced using Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing system. Raw reads were de novo assembled, and 162 contigs with high similarity with plant mitoviruses were identified. Six sequences showing ORFs with mitovirus RdRp motifs and phylogenetically related to viruses of the genus Mitovirus were identified and named Passiflora mitovirus-like (PMV). Oligonucleotides were synthesized for PCR and RT-PCR and used to amplify the mitovirus-derived fragments of PMV1, 2, and 3 from RNA and DNA extracted from passionflower leaves. PMV1 and PMV2 could be amplified fromRNA and DNA from a high diversity of *Passiflora* spp, evidencing a possible endogenization or horizontal gene transfer (HGT). The complete genome of the PMV1 and PMV2 NERVES was recovered from passionfruit samples, cloned, and sequenced, and they have small ORFs showing identities with mitovirus. However, no DNA corresponding to PMV3 was detected, excluding the endogenization of this sequence. Overall, we present here the first evidence of mitovirus infection in Passiflora spp. The recovery of mitovirus-derived fragments from RNA samples indicates that PMV1 and 2 are capable of being transcribed.

Keywords: Mitoviridae, RNA virus, plant virus.

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro, planta pertencente à família Passifloraceae, possui grande valor econômico e social para o as regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, principalmente o Brasil (MELETTI, 2011). Existem mais de 150 espécies nativas do Brasil e, destas, o maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis f.* flavicarpa Degener) destaca-se quanto as suas aplicações na culinária, indústria farmacêutica e agronômica (MELETTI, 2011).

Uma das principais causas da queda na produção dos frutos do maracujazeiro está relacionada à doenças causadas por vírus (PERUCH; COLARICCIO; BATISTA, 2018). Estudos de metagenômica viral realizados pelo grupo de pesquisa em vírus de plantas coordenado pela Dra. Simone da Graça Ribeiro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), têm identificado vírus que infectam maracujazeiros coletados na Bahia e em diferentes locais do Centro-Oeste brasileiro. Nestas pesquisas, curiosamente, foram encontradas sequências homólogas a vírus membros do gênero *Mitovirus*.

Os mitovírus pertencem a um grupo de micovírus da família *Mitoviridae*, que tem genoma de RNA de fita simples e que podem causar hipovirulência em fungos fitopatogênicos (RAN et al., 2016; XU et al., 2015). Entretanto, nos últimos quatro anos, estudos têm identificado vírus deste gênero em plantas suscetíveis a fungos fitopatogênicos (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015; GOH et al., 2018; NERVA et al., 2019; NIBERT et al., 2018; SILVA et al., 2017; VONG et al., 2019).

Sendo o maracujazeiro uma frutífera cuja produção pode ser afetada por fungos fitopatogênicos (BUENO et al., 2014; DA SILVA et al., 2017; PARISI et al., 2018; TARNOWSKI; PLOETZ, 2010) e as recentes descrições de mitovírus associados a plantas, é de se esperar que a utilização de técnicas modernas de sequenciamento gênico fosse levar à descoberta de mitovírus associados ao gênero *Passiflora*. Todavia, até o presente momento, não há estudos relacionados a infecções causadas por mitovírus em maracujazeiros. Sendo assim, este trabalho teve como principal foco desenvolver um amplo estudo de identificação e caracterização molecular de mitovírus em diferentes espécies de *Passiflora spp*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar vírus pertencentes ao gênero *Mitovirus* associados a maracujazeiros (*Passiflora spp.*), utilizando tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (do inglês, *High-Throughput Sequencing Technologies* – HTS) e realizar caracterização molecular desses vírus por meio de análises moleculares e filogenéticas.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência de vírus pertencentes ao gênero Mitovirus em maracujazeiros;
- Sequenciar e montar o(s) genoma(s) completo(s) desses vírus;
- Estudar a diversidade de mitovírus em *Passiflora* spp.
- Investigar a presença de sequencias de mitovírus endogenizados em maracujazeiros;
- Desenvolver método de diagnose de mitovírus em maracujazeiros por RT-PCR e PCR

3. ESTUDO DA ARTE/ESTADO DO CONHECIMENTO

3.1. O Maracujazeiro

O maracujazeiro é uma planta frutífera, do gênero *Passiflora*, pertencente à família Passifloraceae, da ordem Malpighiales. Esta família reúne principalmente plantas herbáceas ou lenhosas que ocorrem geralmente em bordas de floresta ou em áreas abertas, podendo algumas espécies apresentar hábito arbustivo ou arbóreo, crescendo inclusive no interior de florestas (CERVI, 1997; CERVI; DUNAISKI JUNIOR, 2004; KONDO; CHIBA; SUZUKI, 2015).

O maracujazeiro é comumente chamado de "maracujá" termo de origem tupiguarani que significa "alimento que se toma de sorvo" ou "alimento em forma de cuia". É originário das regiões tropicais, tendo sido descritas 150 espécies nativas no Brasil (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). Nosso país se destaca por sua grande produção de maracujá (CAVICHIOLI et al., 2017), servindo como ótima fonte de renda aos agricultores com diferentes opções de mercado (CAVICHIOLI et al., 2017; FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016; SANTOS et al., 2017). Segundo dados do IBGE, em 2019 o Brasil produziu 593.429t de maracujá, em uma área destinada de 41.800 hectares. O Nordeste destaca-se como maior região produtora, com 382.739t, seguido do Sudeste com 89.769t produzidas no ano.

Intitulado como "fruta da paixão" pelo historiador Giacomo Bosio, que associou estruturas morfológicas da planta com elementos da crucificação de Jesus Cristo, o maracujazeiro possui múltiplo uso, com alto valor comercial. Dentre os genótipos mais cultivados do gênero, destacam-se o maracujá doce (*P. alata*), o maracujá-roxo (*P. edulis*) e o maracujá-amarelo (*P. edulis* f. flavicarpa) (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

O maracujazeiro-amarelo se sobressai na culinária, por apresentar propriedades nutritivas e, devido a isto, é utilizado como ingrediente principal para sucos, doces e sobremesas em geral (MESA; MONTOYA; SANCHEZ, 2019). Além disso, apresenta atividade anti-inflamatória e potencial antioxidante, podendo ser usado no tratamento da hipertensão ou como calmante natural (COQUEIRO; PEREIRA; GALANTE, 2016; MESA; MONTOYA; SANCHEZ, 2019).

Organismos patogênicos como vírus, bactérias e fungos são os principais responsáveis pela queda de produtividade na cultura do maracujazeiro no Brasil (CERQUEIRA-SILVA et al., 2015). Os estudos relacionados às viroses, em maracujazeiros, causadas por organismos com genoma composto por RNA têm sido publicados desde a década de 90. Trabalhos relacionados a infecção e perdas causadas por potyvírus (CHONG et al., 2018; JOVER-GIL et al., 2018; OCHWO-SSEMAKULA et al., 2012), cucumovírus e carlavírus (BARROS et al., 2011; GIORIA et al., 2002; SPIEGEL et al., 2007) são os mais frequentes.

3.2. Mitoviridae: uma nova família de vírus

Composta por um grupo de vírus de genoma extremamente simples, a família *Mitoviridae* agrupa espécies de genoma de fita simples de RNA de senso positivo (ssRNA+) contendo de 2 a 4kb (HILLMAN; CAI, 2013; HILLMAN; ESTEBAN, 2012). Inicialmente, os vírus desta família foram distribuídos no gênero *Mitovirus* incluso na família *Narnaviridae*. Entretanto, com o advento das novas tecnologias de sequenciamento de nova geração, bem como estudos de metagenômica, o número de sequências relacionadas ao gênero aumentou e foram também descritos relatos de mitovírus associados a plantas e insetos (DINAN et al., 2020; NIBERT et al., 2018) e em 2020, a nova família foi oficializada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (do inglês International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV).

Embora tenham genoma de RNA de fita simples, eles podem apresentar-se em fita dupla como um estágio transitório, provavelmente necessário para sua replicação. Além da ausência de um capsídeo, estes vírus não sofrem poliadenilação na porção 3', tampouco parecem possuir uma estrutura cap 5' (HILLMAN; CAI, 2013; HILLMAN; COHEN, 2021; SOLÓRZANO et al., 2000). Seu genoma é composto por uma fase de leitura aberta (do inglês Open Reading Frame, ORF) na fita de senso positivo capaz de codificar uma única proteína, a RNA polimerase dependente de RNA (do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp) (HILLMAN; COHEN, 2021; SOLÓRZANO et al., 2000).

Além disso, localizam-se na mitocôndria e em casos específicos de fungos, utilizam uma característica genética importante do grupo, no qual o *stop codon* UGA deixa de funcionar como códon de parada e passa a codificar o aminoácido triptofano (NERVA et al., 2019; NIBERT, 2017; SHAHI et al., 2019). Evidências apontam que a RdRp produzida por vírus da família *Mitoviridae* e *Narnaviridae* é capaz de se ligar à região 3' do RNA viral, que não possui uma cauda poli-A, protegendo-a da ação de exonucleases (SOLÓRZANO et al., 2000). Análises filogenéticas, usando sequências preditas da RdRp de mitovírus apontam uma relação próxima com a família *Leviviridade*, um grupo composto por bacteriófagos. Ao que tudo indica, estes vírus co-evoluíram durante um possível evento de endossimbiose e perderam o capsídeo (HILLMAN; CAI, 2013). Mais recentemente, os vírus do gênero *Narnavirus* (família *Narnaviridae*) tem sido relacionados com RdRps de vírus do gênero *Ourmiavirus*, da família *Botourmiaviridae* (HILLMAN; COHEN, 2021; NERVA et al., 2019; TURINA et al., 2017).

Os primeiros registros de vírus da família *Narnaviridae* foram observados em cepas comerciais de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e pertencem ao gênero *Narnavirus*. As espécies, inicialmente chamadas de SCNV20S e SCNV23S, foram caracterizadas como bastante estáveis, capazes de codificarem uma proteína do tipo RdRp. Apesar da alta taxa de infectividade e reprodução nestes organismos, modificações morfológicas no hospedeiro não foram observadas (KADOWAKI; HALVORSON, 1971; WESOLOWSKI; WICKNER, 1984).

Diferentemente dos mitovírus, os vírus do gênero *Narnavirus* se replicam no citoplasma. Além disso, análises de transcriptomas de insetos e outros organismos eucariontes, revelaram a presença de uma ORF na posição reversa (rORF) ocupando em torno de 90% a 98% da fita de senso negativo em membros do grupo supracitado (DERISI et al., 2019; DINAN et al., 2020). Apesar da baixa taxa de conservação de aminoácidos, os autores acreditam que a rORF seja capaz de codificar uma proteína *bona fide* que auxilia o processo de replicação destes vírus no citoplasma do hospedeiro. Até o presente momento, não há relatos de ORFs semelhantes em mitovírus.

3.3. Mitovirus

Os mitovírus, assim como os narnavírus, possuem genoma de ssRNA+ e não tem capsídeo, sendo inicialmente tidos como um grupo de vírus específicos de fungos. Sua sub-localização celular é uma das principais características deste grupo (HILLMAN; CAI, 2013). Estudos apontam uma preferência pela mitocôndria dos hospedeiros, sendo umas das principais evidências a capacidade de determinados membros do grupo utilizarem o códon de parada UGA para codificar triptofano durante seus processos de transcrição e tradução – uma especificidade do código genético mitocondrial de alguns fungos (AKOPYANTS et al., 2016; NIBERT, 2017). Diferentemente dos narnavírus, os mitovírus podem causar alterações fenotípicas como a deformação da mitocôndria do hospedeiro e reduzir a virulência de fungos fitopatogênicos (WU et al., 2010; XU et al., 2015).

Apesar da ausência de proteínas de capsídeo ou estruturas como uma cauda poli-A ou um cap 5', os mitovírus desenvolveram estratégias de sobrevivência como, por exemplo, organizar-se em um estágio provisório de dupla-fita dsRNA durante seu estágio de replicação (LAKSHMAN; JIAN; TAVANTZIS, 1998). Além disso, são capazes de formar estruturas como *Hairpin loop* em seus terminais 5' e 3' ou até mesmo apresentar-se em *panhandle*, desta forma garantindo uma estabilidade ao ssRNA e protegendo-o de possíveis degradações (NERVA et al., 2019; SAHIN; AKATA, 2019; WU et al., 2010).

Embora a característica marcante de possuírem uma única ORF em seu genoma, Wu e colaboradores (2010) descreveram o genoma de Botrytis cinerea mitovirus 1 (BcMv1), contendo uma pequena região potencialmente codificante para um peptídeo de 44 aminoácidos, além da RdRp. Esta pequena ORF também foi identificada nos genomas de Cryphonectria parasitica mitovirus 1-NB631 e Sclerotinia homoeocarpa mitovirus. Apesar dos autores não encontrarem proteínas ou peptídeos homólogos a esta pequena região de BcMV1, pequenas ORFs codificantes para peptídeos com funções desconhecidas em outros micovírus já foram descritas anteriormente (CHIBA et al., 2009).

Embora tenham sido descritos inicialmente como vírus que infectam fungos, vírus do gênero *Mitovirus* têm sido identificados em plantas (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015; GOH et al., 2018; NIBERT et al., 2018; SILVA et al., 2017; VONG et al., 2019) e também em insetos (FONSECA et al., 2020), sugerindo que estes vírus possuam uma gama muito maior de hospedeiros do que anteriormente proposto.

Sequências homólogas a mitovírus, contendo regiões conservadas (*motifs*) na RdRp foram descritas como endogenizadas em genomas mitocondrial e nuclear de plantas. Acredita-se que o genoma viral possa ter sido capturado por uma transcriptase reversa ou por retrotransposons promíscuos do organismo hospedeiro. Em *Arabidopsis thaliana*, sequências *mitovirus-like* do DNA mitocondrial são capazes de codificar um RNA (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015; SILVA et al., 2017).

23

Quanto à infectividade destes micro-organismos em plantas, Nerva e colaboradores (2019) relatam a transmissão vertical de Chenopodium quinoa mitovirus 1 (CqMV1) através de sementes, não tendo sido verificada a transmissão horizontal por inoculação mecânica ou enxertia. Vong e colaboradores (2019) ao estudar Beta vulgaris mitovirus 1 em beterrabas e acelgas também relatam transmissão vertical. Até o presente momento, não existem relatos de infecção por mitovírus em maracujazeiros.

3.4. Elementos virais de RNA não-retroviral endogenizados

Os elementos virais de RNA não-retroviral endogenizados (do inglês *Non-retroviral Endogenous RNA Viral Elements,* NERVEs) resultam de um processo de transferência horizontal de genes (THG) entre o vírus e o hospedeiro, no qual cópias do genoma viral são integrados nos cromossomos do hospedeiro e são transmitidos verticalmente para seus descendentes (AIEWSAKUN; KATZOURAKIS, 2015; CHU; JO; CHO, 2014). A principal hipótese é de que este tipo de evento seja causado por proteínas promíscuas, como retrotransposons e transcriptases reversas (COTTON et al., 2016; CROCHU et al., 2004; GEUKING et al., 2009; TANNE; SELA, 2005).

A endogenização de genomas virais não é processo desconhecido e retrovírus, por exemplo, são conhecidos por possuírem a endogenização do seu genoma completo como um estágio obrigatório durante o seu ciclo viral (GOFF, 1992). Além disso, mecanismos de reparo de DNA e recombinação gênica podem ocasionalmente integrar fragmentos de vírus de DNA. A endogenização de vírus de RNA não-retroviral, por sua vez, requer etapas que normalmente não ocorrem em seus ciclos (Figura 1), iniciando pela conversão da fita de RNA em DNA, a entrada no núcleo da célula hospedeira e a integração do genoma viral no cromossomo (AIEWSAKUN; KATZOURAKIS, 2015; DA FONSECA et al., 2016).

NERVEs consistem em uma sequência viral inteira ou fragmentos dela integrados no genoma do hospedeiro (MARCON et al., 2017) e tem sido relatados em uma grande diversidade de organismos eucarióticos, incluindo plantas (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015; CHIBA et al., 2011; CHU; JO; CHO, 2014; COTTON et al., 2016; HORIE et al., 2010; LIU et al., 2010). As vantagens de eventos de THG no sentido vírus > hospedeiro ainda é incerta e precisa ser mais bem estudada. Sequências virais endogenizadas em plantas foram descritas por expressar pequenos

RNAs que podem participar de vias de silenciamento gênico, desta forma atuando como um sistema de defesa da planta contra o vírus (DA FONSECA et al., 2016; MARCON et al., 2017; NOREEN et al., 2007; VILLACRESES et al., 2015).

Figura 1. Esquema de integração de sequências de mitovírus por meio de captura de um retrotransposon promíscuo. A sequência de RNA viral na mitocôndria pode ser capturada por um complexo de retrotransposon (1) que consiste em uma enzima transcriptase reversa e uma integrase que são responsáveis por converter o RNA de fita simples em um DNA de fita dupla e integrar a nova sequência no genoma mitocondrial (mtDNA) da planta (2), respectivamente. As sequências integradas (MvNERVE), por sua vez, podem ser transcritas (3) e eventualmente serem capturadas (4) e integradas novamente no mtDNA.



Fonte: Autoria pessoal. Criado utilizando o site BioRender.com

O estudo de vírus endogenizados é importante para entender os eventos que ocorreram durante a co-evolução entre hospedeiro-parasita. Além disso, os vírus desempenham papel importante na TGH ao contribuir para a diversidade genética dos organismos (CHU; JO; CHO, 2014; MARCON et al., 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no laboratório de Interação Planta-Praga III (LPP3) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), localizado em Brasília – DF. Neste, deu-se continuidade ao desenvolvimento da pesquisa realizada no referido laboratório, onde foram analisadas amostras de tecidos foliares de maracujazeiros (apêndice) coletadas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) "Flor da Paixão" localizado na Embrapa Cerrados (Brasília – DF) e em diferentes locais do estado da Bahia, Brasil.

Para esta pesquisa, foram utilizadas sequências obtidas de RNA viral anteriormente extraídas e enriquecidas utilizando a técnica de isolamento de RNA de dupla fita (dsRNA) por cromatrografia de afinidade em coluna de celulose conforme descrito por Vidal e colaboradores (2021). Com o material extraído foram construídos 5 *pools* de dsRNA (apêndice), sendo 3 *pools* referentes a biblioteca do BAG (nomeados de BAG-1, BAG-2 e BAG-3) e dois *pools* referentes às amostras do campo da Bahia (nomeados como PM1BA e PM2BA) que foram enviados para sequenciamento de alto desempenho (do inglês, *High Troughput Sequence* - HTS) na plataforma *Illumina HiSeq 2500*. O software FastQC foi utilizado para avaliar a qualidade foram trimados utilizando o software Prinseq-lite 0.20.4 (ANDREWS, 2010). *Contigs* foram gerados a partir dos *reads* utilizando a técnica *De novo assembly* com os softwares ABySS (Assembly By Short Sequences), SPAdes assembler e CLC Genomics Workbench version 6.3 (BANKEVICH et al., 2012; SIMPSON et al., 2009).

Para a filtragem dos resultados, um blastx foi realizado para identificar sequências com alta similaridade com mitovírus. Para a montagem de sequências aparentemente completas, *contigs* contendo tamanho >1kb foram selecionados e utilizados como referências para realizar um *map to reference* dos *reads* com auxílio da ferramenta embutida no *software Geneious*. A sequência consenso foi extraída e o mapeamento foi repetido até a obtenção de uma sequência putativamente completa ou nenhuma extensão adicional. Prováveis ORFs foram anotadas com auxílio da ferramenta ORFfinder do NCBI (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/</u>). Estruturas secundárias das regiões UTR foram preditas por meio do servidor RNAfold (<u>http://rna.tbi.univie.ac.at//cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi</u>).

4.1. Extração de Ácidos Nucleicos

Para a detecção por meio de RT-PCR e PCR de sequências mitovirais foram utilizadas amostras de RNA total e DNA genômico das amostras de maracujá de cada biblioteca. Para a realização de ambas as extrações, pequenos discos (em torno de 1cm) de amostras foliares foram coletados, separados em tubos diferentes (um para DNA e um para RNA) e macerados em nitrogênio líquido dentro de um tubo de 1,5mL, utilizando pistilos de plástico devidamente esterilizados. Logo após, foram submetidas aos protocolos descritos abaixo. Os reagentes utilizados estão detalhados nos anexos.

4.1.1. Extração de RNA total

O RNA foi extraído por meio do protocolo do reagente TRIzol® Reagent (Invitrogen). Em cada tubo contendo amostras maceradas foi adicionado 1mL de Trizol. As amostras foram, então, homogeneizadas com auxílio de um vortex e incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente. Logo em seguida foi adicionado 0.2mL de clorofórmio em cada amostras, agitadas com a mão por 15 segundos e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas a 12000rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para novo tubo. 500µL de isopropanol (100%) foi adicionado e após agitação, as amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Para a precipitação do RNA foi realizada uma nova centrifugação (12000rpm) por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol (75%), centrifugado a 7500rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secadas a temperatura ambiente na bancada por 10 minutos. O pellet foi solubilizado em 50µL de água autoclavada com auxílio de pipeta e, por fim, as amostras foram aquecidas a 55°C por 10 minutos para total solubilização do *pellet*. A quantidade de RNA foi medida por meio de espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop ND-1000 (NanoDrop TechnologiesTM).

4.1.1.1. Tratamento com DNase

Para evitar contaminação por DNA e, consequentemente de sequências endogenizadas, o RNA utilizado para RT-PCR foi submetido à tratamento com DNase (TURBO™ DNase, *AMBION life technologies*). Para isso foi realizada uma reação

contendo 1µL de tampão 10x Turbo DNase, 1µ de Turbo DNase e 7µL de RNA com concentração variando entre 600 a 800ng/µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora e a reação foi interrompida adicionando 1µL de EDTA (25mM) durante incubação a 65°C por 10 minutos. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20°C.

4.1.2. Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico de maracujazeiros foi utilizado protocolo com tampão de extração CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) com algumas modificações. Para cada amostra macerada, foi adicionado 800µl de tampão CATB contendo β -mercaptoetanol (2%), e imediatamente foram mixadas vigorosamente com ajuda de um vortex. Em seguida adicionou-se 400µL de solução clorofil (Clorofórmio/Álcool Isoamilico, 24:1) e as amostras foram aquecidas em banho seco a 55°C por 10 minutos. Posteriormente, elas foram centrifugadas a 13.200 rpm por 10 minutos e 400µL da fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5ml novo. Foi adicionado 480µL (cerca de 1,2x do volume coletado) de isopropanol (100%) e os tubos foram invertidos manualmente para, então, serem centrifugados a 13200rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 500µL de etanol 70% foi adicionado e as amostras foram centrifugadas mais uma vez por 10 minutos, na mesma velocidade. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram secadas a temperatura ambiente e o *pellet* foi solubilizado em 50µL de TE+RNase com incubação a 37° por 30 minutos.

4.2. Recuperação dos genomas virais, clonagem molecular e sequenciamento

4.2.1. Desenho dos primers

Sequências de possíveis genomas completos foram geradas a partir dos *contigs* com alta similaridade com outros mitovírus *de* planta e foram denominadas de passiflora mitovirus-like (PMV). Para confirmação da presença dessas sequencias nas amostras de maracujá, *primers* específicos foram desenhados utilizando a ferramenta *primer* design do programa *Geneious*. Foram desenhados inicialmente primers para confirmação da presença das sequencias virais nas amostras e posteriormente primers para amplificação da ORF de RdRp completa de cada uma. Na tabela 1 estão descritos os primers utilizados nessa pesquisa. **Tabela 1** Primers utilizados para reações de PCR e RT-PCR para PMV1, PMV2 e PMV3 nos *pools* de RNA de amostras do BAG (BAG 1 - 3) e da Bahia (PM1BA e PM2BA).

ALVO	Nome do <i>primer</i> Sequência 5' – 3'		ΤM¹	Amplicon ²
	Bag3_Mito1-1_641F Bag3_Mito1- 2 2300R	3ag3_Mito1-1_641F AAGAGATTCAATCCTCTTTCCGGAA Bag3_Mito1- TCGCCCTATCATACAACTTCCATAG 2 2300R TCGCCCTATCATACAACTTCCATAG		1660pb
PMV1	PMV1_53F PMV1_2633R	AACAGGCTCGACGACATCAG GGGGTTTTCTACGCGGAAGA	60	2580pb
	PMV1RDRP_F	GAACAACCGTTGGTCTGTGC	60	226pb
	PMV1RDRP_R	AGGTAGGGATTGAGGGGCAT	60	
	Bag3_Mito2-2_379F Bag3_Mito2- 2 1076R	ATTTTGCTCTCATGGTTTGATTGGT CCTTAGGATGCAAAACCTTTCACTT	60	700pb
FIVIVZ	_ mtPePMV2_65F PMV2FLM_3652R	GTATTATGAAGCTATTGAAACTG AACAGATGCGGATGAATTAGCTGTTAA	58	2290pb
	Mito331F GGTTTCATCTCTCCAGGTAGGTTAG MitoB4331299R GTTAGGAACCCATTCAAAGCTCAAA		55	1274pb
PMV3	MV3_936R	TCTGAACACCCATCATATCTAATAAAACAC	55	
	MV3_1174R	ATAACCTTTAATCTTCGCCACCTTCTTCCT	55	

Fonte: autoral (2021). ¹ Temperatura de anelamento dos primers em ^oC. ² Tamanho esperado do amplicon em pares de base (pb).

4.2.2. Síntese de cDNA (DNA complementar) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para confirmar a presença de mitovírus nas amostras foram realizadas reações de RT- PCR. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total das amostras utilizando a transcriptase reversa *Next Generation M-MLV RNAse H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Promega) nas seguintes condições: 10μ L de RNA em uma concentração entre 600 a 800ng/ μ L, 0.5μ L de *random primers* (10μ M), 0.5μ L de OligoDT (50μ M), 1μ L de dNTP. A mistura foi mantida à 75°C por 5min em banho seco e, logo em seguida, resfriada por 3min em gelo. Após isso, uma segunda etapa foi feita em uma reação contendo 1μ L de MMLV (200U), 1μ L de RNAseOUT (200U), 1μ L de tampão 3X e 2μ L de DTT (0.1M) à 37°C por 1h e 75°C por 15 min em termociclador. 29 A PCR foi realizada utilizando uma enzima de alta fidelidade *KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR kit* (KAPABIOSYSTEMS) nas seguintes condições: 1µL de cDNA, 5µL do mix contendo enzima, 0,5µL de cada primer (*foward/reverse*), e quantidade suficiente de água para completar 10µL de reação. Na programação foi utilizado o esquema proposto pelo fabricante da enzima, um ciclo de desnaturação inicial a 98°C por 3min; 25 ciclos de desnaturação a 98° por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 2min30s (para amplificar genomas completos e 60 segundos para detecção em amostras); por fim, um ciclo de extensão final à 72°C por 5m. Para avaliar a presença de fragmentos endogenizados, foi utilizada a mesma reação de PCR, neste caso utilizando DNA genômico das amostras.

O resultado das reações foi visualizado em gel (1% agarose) corado com *syber safe*. Bandas correspondentes aos fragmentos de tamanho esperado foram visualizadas utilizando transiluminador de luz led azul, cortadas e purificadas com kit *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

4.3. Clonagem do produto de PCR e sequenciamento

Cada fragmento purificado foi ligado ao vetor pJET1.2/blunt (*Thermo Scientific*) e introduzido em células competentes de *Escherichia coli* DH10B por choque térmico. Os clones foram selecionados em placas contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina (100ug/ml) e incubados em estufa (37° C/± 16 horas). As colônias crescidas foram inoculadas em 3mL de LB líquido contendo ampicilina (100ug/ml) e incubadas a 37°C (*overnight*).

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos por meio de inóculos de colônias isoladas e purificados em pequena escala (Miniprep) utilizando protocolo adaptado (SAMBROOKE; RUSSELL, 2001). Para tanto, 2mL de cada inóculo foram transferidos para tubos de 2mL e então centrifugados a 12000rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi solubilizado utilizando 100µL da solução de ressuspensão (Solução I, anexo) com auxílio de um aparelho vortex. Logo após foi adicionado 200µL de da solução II (anexo) e misturadas gentilmente 9 vezes e então 150µL da solução III (anexo) foi acrescido e agitadas novamente 9 vezes. As amostras foram então incubadas no gelo por 5 minutos e centrifugadas (12000rpm) por 10 minutos. Em torno de 450µL do sobrenadante foi coletado e transferido para novos

tubos onde foi adicionado 900µL (equivalente a 2 volumes do coletado) de etanol absoluto e homogeneizadas gentilmente. As amostras foram centrifugadas mais uma vez a 12000rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi então lavado com 1mL de etanol (70%) e centrifugado (12000rpm) por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi secado naturalmente na bancada por 10 minutos e logo em seguida solubilizado em 50µL de TE+RNase (apêndice) e incubados a 65°C por 10 minutos para completa solubilização.

A presença de insertos no clone recombinante foi comprovada utilizando a enzima de restrição BgIII e, logo em seguida, identificadas após eletroforese (1% agarose) por meio da visualização de bandas de tamanhos esperados. Após confirmação, as amostras positivas foram submetidas a um segundo Miniprep por meio do kit *Wizard plus Sv minipreps DNA purification system* (PROMEGA) e encaminhadas para sequenciamento do tipo Sanger na empresa MACROGEN (Coreia do Sul). As sequências genômicas completas foram montadas por meio da técnica *de novo assembly* do programa *Geneious*.

As sequências obtidas pelo sequenciamento do tipo Sanger foram alinhadas entre si utilizando a ferramenta MAFFT embutida no programa *Geneious* 11, a partir dos algoritmos padrões do *software*. Os escores de identidade par-a-par de aa por proteína foram calculados com o programa SDT (Sequence Demarcation Tool Version 1.2- SDTv1.2) e as matrizes geradas foram utilizadas para a construção de um heatmap por meio do servidor Evolview v2 (evolgenius.info/).

4.4. Dot blot

Para a detecção de PMV3 em amostras de maracujazeiros coletadas na Bahia e no BAG flor da paixão, foi realizado um dot blot. Para o preparo da membrana (*Amersham Hybon XL*) foi utilizado em torno de 1,5 ug das amostras de RNA total, tratado com DNase, de cada planta. Como molde para a sonda, foi utilizado um fragmento de 1,2kb de mitovirus-like correspondente ao PMV3 obtido por RT-PCR a partir do *pool* PM2BA. A sonda foi preparada com o kit *Amersham Redprime II DNA Labeling System* de acordo com as instruções do fabricante utilizando o desoxinucleotídeo marcado α ³²PdCTP. A hibridização foi realizada conforme protocolo já descrito (GUIMARÃES; BEZERRA; ARAGÃO, 2015). O produto de PCR, utilizado como molde para a sonda, foi diluído para as concentrações 5ng/µL, 1ng/µL, 0,1 ng/µL, 0,05 ng/µL e 0,01 ng/µL e estas foram utilizadas como controle positivo da reação.

4.5. Análises filogenéticas

Para analisar a relação filogenética das sequências de passiflora mitovirus-like (PMV) montadas e amplificadas nas amostras de maracujá, foi utilizada a sequência de aminoácidos da proteína RdRp deduzida a partir da ORF anotada. As sequências foram alinhadas juntamente com outras sequências de RdRp de mitovírus publicadas no *GenBank (*Anexo I) utilizando a ferramenta MAFFT embutida no programa *Geneious* 11, a partir dos algoritmos padrões do *software*. A árvore filogenética do tipo Máxima Verossimilhança (ML) foi construída por meio do o *software* IQ-TREE, utilizando o modelo de substituição rtREV+F+I+G4 e os valores de suporte dos clados foram calculados utilizando a ferramenta *ultrafast bootstrap* (GUINDON et al., 2010; Nguyen et al, 2015; HOANG et al, 2017).

Para identificar a presença de regiões conservadas ao longo das sequências, o alinhamento das sequências foi refeito, utilizando apenas as sequências de aa da RdRp de Beta vulgaris mitovirus 1 (GenBank: DAC76744) e Chenopodium quinoa mitovirus 1 (Genbank: YP_009551903) com as RdRp preditas de PMV. O arquivo de alinhamento foi submetido ao servidor ESPript (https://endscript.ibcp.fr/ESPript/cgibin/ESPript.cgi) para análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Evidências de mitovirus em Maracujazeiros (Passiflora spp.)

5.1.1. Análise do HTS de dsRNA de amostras de folhas de *Passiflora* spp e montagem de sequências de mitovirus-like

A partir dos *reads* obtidos com o resultado do sequenciamento HTS das amostras de dsRNA de maracujazeiro foram montados *De novo* um total de 162 *contigs* com alta similaridade com mitovírus, com tamanhos variando de 78pb a 5794pb. Destes, 112 foram obtidos a partir das bibliotecas do *pool* BAG-1; 22 do *pool* BAG-2; 21 do *pool* BAG-3; dois do *pool* PM1BA e cinco do *pool* PM2BA. *Contigs* com tamanho maior que 1kb foram filtrados para análises. *Contigs* similares a vírus de outros gêneros também foram observados e alguns já estão descritos na literatura (VIDAL et al, 2018; VIDAL et al, 2021), para este estudo somente sequencias mitovirais foram consideradas.

Os mitovírus são caracterizados por possuírem uma única ORF em seu genoma ssRNA(+) que codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) deduzida (HILLMAN; COHEN, 2021). Utilizando a ferramenta "*map to refference*" do software *Geneious*, foi possível obter a partir de seis *contigs* diferentes, sequências aparentemente completas, de senso positivo e com uma única ORF em cada. Duas dessas sequências, possuíam identidade de 99,99% entre os nucleotídeos, sendo assim consideradas como iguais e apenas uma delas foi incluída nas análises posteriores. Após a triagem, as sequências completas foram nomeadas como "passiflora mitovirus-like" (PMV), com tamanho variando entre 2.6kb a 3.3kb (figura 2).

Figura 2. Representação esquemática da organização genômica das sequências de mitovirus-like associadas à maracujazeiros. A esquerda, o nome dado para cada sequência (**PMV** = Passiflora mitovirus-like). O tamanho dos genomas em nucleotídeos (nt) são indicados do lado direito. A ORF única, que codifica uma proteína RdRp predita está destacada em cinza. As posições de nucleotídeos do início e fim de cada ORF são representadas.

PMV1	190	RNA-dependent RNA polymerase	2484	3045
PMV3	253	RNA-dependent RNA polymerase	2553	2641
PMV4	186	RNA-dependent RNA polymerase	2732	2 3383
PMV5	270	RNA-dependent RNA polymerase	2537	2654
PMV6	272	RNA-dependent RNA polymerase	2503	2687

Fonte: autoral (2021).

As ORFs anotadas codificam uma proteína deduzida com tamanho variando entre 742aa a 849aa, tamanho aproximadamente esperado para uma RdRp de mitovírus de fungos e plantas (HILLMAN; CAI, 2013; NERVA et al., 2019; WU et al., 2010). Quando realizado um *blastx* das sequências preditas, foi observado que quatro (PMV3, PMV4, PMV5 E PMV6) das cinco sequências possuem maior identidade com Humulus lupulus mitovirus 1, enquanto PMV1 obteve maior *hit* com Solanum chacoense mitovirus 1 (tabela 2).

Além das cinco sequências apresentadas, um *contig* com tamanho de 1200pb apresentando 47% de identidade com Chenopodium quinoa mitovirus 1 (CqMv1) (cobertura de 98%; *e-value* 5e-101) foi observado. Ao realizar um *map to refference* foi possível obter uma sequência de 5.5kb. Curiosamente, devido a existência de uma série de códons de parada, não foi possível fazer a anotação de uma ORF, nem mesmo ao utilizar o código genético mitocondrial de fungo. Apesar disso, quando realizado o *blastx* é possível observar *motifs* de mitovírus na sequência.

Pensando nisso, foram feitas inserções aleatórias de "N" ao longo da sequência predita, nas posições 2587, 2716, 2964 e 3061, numa tentativa de corrigir eventuais erros de frame e assim recuperar uma fase de leitura aberta capaz de obter uma sequência de aminoácidos com domínios conservados de uma RdRp. Tal técnica é utilizada para realizar alinhamentos de genes não expressos que sofrem alterações em suas sequências de nucleotídeos devido a ação de transposases (CARVALHO et al., 2015). Com isso, utilizando o código genético universal, foi possível obter uma longa ORF no frame 1 apresentando 1140nt e proteína deduzida de 379aa (figura 3. A), a qual possui o domínio GDD conservado de replicases (figura 3. B) e ~70% de identidade com CqMv1 em uma cobertura 94%. A sequência de aa deduzida desta ORF foi utilizada para as análises filogenéticas. Como esta sequência foi a segunda a ser montada, embora não contenha uma ORF putativa, foi denominada de PMV2.

Figura 3. Representação esquemática de PMV2. **A**. Esquema da organização genômica predita de PMV2 contendo em torno de 5505pb. *Contig* original destacado na seta dupla. Fase de leitura aberta recuperada destacada em cinza, números indicam a sua posição (nt) na sequência. Triângulos acima da ORF destacam posições das inserções realizadas para recuperação do frame e obtenção da referida ORF putativa. **B**. Representação esquemática da proteína predita da ORF recuperada de PMV2, *motifs* conservados de *Mitovirus* e domínio GDD de RdRp estão representados em vermelho.



Fonte: autoral (2021).

Ao alinhar as sequências de aminoácidos preditas das ORFs foi possível observar *motifs* (figura 4) característicos de mitovírus (HONG et al., 1998) nas sequências de PMVs. Uma vez que o domínio GDD é considerado o domínio ativo da enzima e responsável por função de replicação da RdRp, pode-se considerar que estas sequências, com exceção de PMV2, possam ser capazes de expressar proteínas funcionais (HONG; HUNT, 1996; SHWED et al., 2002; VÁZQUEZ; ALONSO; PARRA, 2000; WANG; GILLAM, 2001). Apesar de não conseguirmos anotar uma ORF na sequência de PMV2, a obtenção desta sequência por meio do sequenciamento do dsRNA das amostras de maracujazeiros sugere que este RNA, possar ser expresso e ser funcional.

Mitovírus não possuem uma proteína capsidial, entretanto o ssRNA destes vírus possui uma alta estabilidade, provavelmente garantida pela presença de estruturas secundárias nas regiões 5'-não-codante (do inglês *untranslated region*, UTR) e 3'-UTR (HILLMAN; ESTEBAN, 2012; NERVA et al., 2019; WU et al., 2010). Quando investigado, foi possível observar estruturas em forma de *stemloop* na maioria das sequências obtidas pelo HTS. Os valores em kcal/mol estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2. Características moleculares das sequências preditas de mitovirus-like, associadas a maracujazeiros, montadas a partir dos dados de HTS. Predição de estrutura secundárias nas regiões 5'-UTR e 3'-UTR bem como resultados do blastx realizado com cada sequência.

ŋ	Estrutura secundária		Blastx				
Sequênci	5'-UTR ∆ G (kcal/mol)	3'-UTR ∆ G (kcal/mol)	Vírus	Cobertura	E value (menor valor)	ID (%)	Número de acesso no GenBank
PMV1	-	-	Solanum chacoense mitovirus 1	75%	0.0	55.74%	DAB41743.1
PMV2	-48.50	-	Chenopodium quinoa mitovirus 1	39%	0.0	52.28%	YP_009551903.1
PMV3	-19.00	-	Humulus lupulus mitovirus 1	80%	0.0	50.14%	DAB41749.1
PMV4	-	-	Humulus lupulus mitovirus 1	57%	4e-173	46.36%	DAB41749.1
PMV5	-	-33.60	Humulus lupulus mitovirus 1	80%	0.0	48.83%	DAB41749.1
PMV6	-	-0.60	Humulus lupulus mitovirus 1	80%	0.0	46.99%	DAB41749.1

Fonte: Autoral (2021)
Figura 4. Alinhamento das sequências deduzidas das RNA-polimerases dependentes de RNA (RdRps) das sequências de PMVs. Aminoácidos conservados ao longo das sequências estão marcados em vermelho. Destacados em amarelo estão os aminoácidos quimicamente similares. Regiões conservadas (Motifs) de mitovirus (I-VI) indicados abaixo da linha vermelha. **BvMv1** = Beta vulgaris mitovirus 1 (GenBank: DAC76744); **CqMv1** = Chenopodium quinoa mitovirus 1 (Genbank: YP_009551903); **PMV** = passiflora mitovirus-like.



Fonte: Imagem gerada a partir de resultados obtidos pelo servidor ESPript (<u>https://endscript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi</u>) (2021).

Uma análise filogenética foi realizada utilizando sequências completas de RdRp de mitovírus de plantas e fungos disponibilizadas no *GenBank* e como *outgroup* foram utilizados representantes da família *Leviviridae*. Como esperado é possível observar clados distintos entre mitovírus de plantas e mitovírus de fungos (figura 5) como já observado anteriormente (NERVA et al., 2019; NIBERT et al., 2018; XU et al., 2015).

As sequências de RdRps preditas de PMVs se agrupam com outros mitovírus de plantas em um grupo monofilético (Figura 5), sustentando nossa hipótese de que estas sequências provavelmente representam verdadeiros mitovírus. Todavia, para a realização das análises moleculares, como detecção e confirmação, foram selecionadas apenas as sequências PMV1, 2 e 3. **Figura 5.** Análise filogenética inferida com o método máxima verossimilhança (ML) utilizando as sequências de aminoácidos preditas RdRp (número de acesso ao GenBank no anexo X) de representantes da família *Mitoviridae*, *Narnaviridae* e, como grupo externo, representantes da família *Leviviridae*. A família *Mitoviridae* se organiza em três clados conforme descrito anteriormente por Nibert e colaboradores (2018). Sequências de mitovírus associados a plantas compõem um grupo monofilético juntamente com as sequências de passiflora mitovirus-like (PMV) destacadas em vermelho. Os valores de suporte dos clados são descritos ao lado de cada um.



Fonte: autoral (2021).

Segundo dados do ICTV, uma das características dos mitovírus é a sua quantidade elevada de A+U, que varia em torno de 62% a 73% (HILLMAN; ESTEBAN, 2012; NIBERT, 2017). As sequências de PMVs obtidas nesse trabalho possuem entre 48% a 61,6% de A+U (Figura 6), um pouco abaixo do valor reportado na literatura para mitovírus de fungos. Entretanto, essa proporção está mais próxima a de CqMV1 que é abaixo de 60% (NERVA et al., 2019).

A quantidade elevada de A+U nos genomas de mitovírus está relacionada à utilização do códon UGA para codificar o aminoácido triptofano em detrimento ao genoma mitocondrial de alguns fungos (NIBERT, 2017). Uma vez que mitocôndrias de células vegetais e até mesmo de alguns fungos não possuem essa característica tão específica (JUKES; OSAWA, 1990; NIBERT, 2017), é compreensível que mitovírus que infectam plantas não sigam esse padrão, não sendo portanto, um fator tão relevante para a caracterização de vírus do gênero.





Fonte: autoral (2021).

5.2. Caracterização de mitovírus em acessos de *Passiflora spp.* como elementos endogenizados de RNA-não-retroviral

Para detecção de PMV1 e PMV2 em acessos do BAG foram desenhados *primers* a partir dos *contigs* utilizados para construir as sequências completas de mitovírus (Figuras 7A e 8A). Os primers foram testados inicialmente em um *pool* de RNA de amostras e após confirmação da presença de PMV1 e PMV2 nos pools, foram utilizados em reações de RT-PCR em amostras individuais. Uma vez que sequências de mitovírus já foram descritas endogenizadas no DNA mitocondrial de plantas (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015), uma reação de PCR foi realizada utilizando DNA total das mesmas amostras.

Das 38 espécies de maracujazeiro testadas, 25 foram positivas para PMV1 somente nas reações utilizando DNA total das plantas (Figura 7B). Embora não tenha sido possível amplificar PMV1 a partir do RNA total de nenhum dos acessos testados, não descartamos a hipótese de que esta sequência seja expressa e que experimentos mais sensíveis (como um *Northen blot* ou qRT-PCR) possam elucidar essa questão.

Figura 7. Detecção de PMV1 em acessos de maracujazeiro do BAG por PCR. **A.** Representação esquemática de PMV1; primers utilizados para detecção nas amostras individuais são indicados em setas verdes; **Primer Foward (PF) =** Bag3_Mito1-1_641F e **Primer Reverse (PR) =** Bag3_Mito1-2_2300R (tabela 1). **B.** Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com *sybersafe*) fragmentos obtidos por PCR a partir do DNA genômico de diferentes espécies e cultivares de maracujazeiros. Marcador: 1 Star kb ladder Cellco.



Fonte: Autoral (2021).

Para a detecção de PMV2 foi realizada uma RT-PCR utilizando amostras de RNA das amostras referentes ao *pool* BAG-3 uma vez que a sequência foi montada a partir dos *reads* desta biblioteca. Para evitar possível contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase. Um fragmento em torno de 700pb foi 40

amplificado a partir do RNA de 13 acessos diferentes de *Passiflora spp*. (figura 8. B). Uma PCR para controle do tratamento realizado com a DNase foi realizada utilizando o RNA sem realizar a reação de transcrição reversa (RT) e o RNA + RT (apêndice IV), sendo possível obter fragmentos de tamanho esperado apenas do RNA + RT, confirmando que o tratamento com DNAse foi efetivo para eliminar contaminações com DNA da planta.

Para avaliar se PMV2 é uma sequência endogenizada, uma PCR com o DNA das mesmas amostras foi feita utilizando as mesmas condições da RT-PCR. Foi observado que 14 amostras foram positivas quando utilizado DNA total das amostras (Figura 8B). É possível observar também que, apesar de ser positiva para a RT-PCR, não foi possível amplificar um fragmento do PMV2 da espécie *P. maliformis* a partir do DNA, sugerindo a presença do vírus em sua forma replicante e não endogenizada. Apesar disso, ainda não foi possível obter uma sequência de maior tamanho deste isolado, necessitando de mais estudos sobre esta evidência observada. Os fragmentos obtidos de *mitovirus-like* dos acessos de *P. galbana* e *P. maliformis* foram clonados e sequenciados pelo método de Sanger. Os clones de PMV2 tem identidade de 100% entre si e 54% de identidade com Chenopodium quinoa mitovirus 1.

No intuito de identificar se PMV2 é endogenizado em outras espécies de maracujazeiro, observamos que ao todo, das 38 espécies trabalhadas, 29 são positivas para esse vírus (figura 8 B. e C.).

Figura 8. Detecção de PMV2 em acessos de maracujazeiro do BAG por PCR e RT-PCR. **A** Esquema da organização genômica predita de PMV2 contendo em torno de 5505pb. Contig original destacado na seta dupla, abaixo estão os primers utilizados para detecção nas amostras individuais indicados em setas verdes; **Primer Foward (PF) =** Bag3_Mito2-2_379F e **Primer Reverse (PR) =** Bag3_Mito2-2_1076R (tabela 1). Fase de leitura aberta recuperada destacada em cinza. Triângulos acima da ORF destacam inserções realizadas para recuperação o frame. **B**. Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com *sybersafe*) dos fragmentos amplificados a partir do RNA total e do DNA genômico de diferentes espécies de maracujazeiros do pool BAG 3. Marcador 1kb plus **C**. Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com *sybersafe*) dos fragmentos amplificados a partir do DNA genômico de diferentes espécies de maracujazeiros dos pools BAG 1 e 2. Marcador 1 Star kb ladder Cellco.



Fonte: autoral (2021).

A endogenização de vírus aparentemente não é um evento raro, acredita-se que este processo possa ser benéfico para organismo receptor, contribuindo para o aumento da variabilidade genética (ROOSSINCK, 2011). Em plantas, sequências de vírus de RNA foram identificados em uma gama de espécies (CHIBA et al., 2011). Embora a endogenização de vírus de RNA-não retroviral ocorra com partes da sequência, não impede que elas sejam transcritas. Por exemplo, em videiras, uma sequência parcial endogenizada de potato virus Y é capaz de ser expressa (TANNE; SELA, 2005). Além disso, em soja, a endogenização do cucumber mosaic vírus (CMV) permite a produção de pequenos RNA pela planta, provavelmente como mecanismo de defesa contra o vírus (DA FONSECA et al., 2016).

A identificação de mitovírus endogenizados em uma gama de espécies de Passiflora spp. e a evidência de que estas sequências podem ser transcritas abrem um leque de hipóteses sobre a função destes NERVEs. Em mamíferos, elementos endogenizados derivados de retrovírus (ERVS) constituem uma grande porcentagem dos genomas de seus hospedeiros e alguns são responsáveis por garantir proteção contra vírus relacionados por meio de competição de receptores (ARNAUD et al., 2007). Não é possível estipular que a integração de mitovírus confira resistência a planta por esse tipo de competição, uma vez que fitovírus não necessitam de receptores para ocasionar uma infecção (NAVARRO; SANCHEZ-NAVARRO; PALLAS, 2019). No entanto, pela capacidade de mitovírus integrados no DNA mitocondrial serem transcritos (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015), pode-se sugerir que estes participem de algum processo durante o estresse, uma vez que a mitocôndria participa numa gama de processos contra fatores bióticos e abióticos, atuando em vias de sinalização celular, produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na indução de apoptose (JACOBY et al., 2012; LIBERATORE et al., 2016; NERVA et al., 2019; TAIT; GREEN, 2012).

Poderíamos, ainda, levantar a hipótese de que estas sequências endogenizadas promovam a geração de pequenos RNAs interferentes (do inglês, *small interfering* RNAs, siRNAs), assim, atuando no sistema imune da planta contra vírus semelhantes através de vias de silenciamento gênico por complexos do tipo RISC – um mecanismo não raro e provavelmente presente em todas as plantas (BAULCOMBE, 2004). Sequências de RNA viral endogenizadas em plantas já foram descritas por estar relacionadas a produção de siRNAs (BOLOGNA; VOINNET, 2014; DA FONSECA et al., 2016). No entanto, CqMv1 parece não ser atingido por esse tipo de via de silenciamento gênico (NERVA et al., 2019). Suzuki e colaboradores (2020) apontam evidências de que um gene resultado da endogenização de um vírus de RNA-não retroviral em inseto, promove a produção de pequenos RNAs e ativa a via de silenciamento gênico antiviral piRNA na presença de vírus com sequências semelhantes ao do vírus endogenizado.

Em virtude da ausência de amostras de RNA de alguns acessos e a impossibilidade de uma nova coleta em decorrência da pandemia do novo coronavírus, não foi possível realizar testes de RT-PCR para detecção de PMV2 nas amostras da figura 8C.

5.2.1. Obtenção dos genes de RdRp mitovirais (PMV1 e PMV2) completos

Para amplificar um fragmento de *Mitovirus*-NERVE contendo as ORFs completas de PMV1 e PMV2, foram desenhados primers para PCR e RT-PCR a partir da sequência gerada com dados do HTS. Cada par de *primers* foi testado em alguns acessos de maracujazeiros provindos do BAG. A partir dos primers desenhados para PMV1, foi amplificada um fragmento em torno de 2.6kb, enquanto que para PMV2 foi obtido um produto de 2.2kb a partir do DNA genômico (figura 9). Em nenhum dos acessos testados foi possível amplificar por RT-PCR um fragmento com os mesmos primers a partir do RNA total.

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com *sybersafe*) dos fragmentos amplificados a partir do DNA genômico de Passiflora spp. para obtenção das sequências completas das ORF de RdRp de PMV1 e PMV2. **A**. Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com *sybersafe*) dos fragmentos amplificados a partir da PCR do DNA genômico *de P. alata, P. elegans* e *P. gardneri* utilizando a combinação de primers PMV1_53F + PMV1_2633RB para amplificar a sequência completa da RdRp de PMV1. **B**. Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com *sybersafe*) dos fragmentos amplificados a partir da PCR do DNA genômico *de P. alata, P. elegans* e *P. gardneri* utilizando a combinação de primers mel de agarose (1%, corado com *sybersafe*) dos fragmentos amplificados a partir da PCR do DNA genômico de *P. eichleriana, P. alata, P. elegans, P. racemosa* e *P. edulis* utilizando a combinação de primers mtPePMV2_65F + PMV2FLM_3652R para amplificar a sequência completa da RdRp de PMV2.



Fonte: autoral (2021)

Os fragmentos obtidos a partir do DNA total foram sequenciados pelo método Sanger utilizando *primer walking*. Os clones de PMV1 de *P. elegans* e *P. gardneri* possuem em torno de 99% de identidade entre si e 99% de identidade com a sequência predita a partir dos dados do HTS (Figura 10A) Apesar de podermos observar uma banda fraca de tamanho esperado na amostra de *P. alata* (Figura 9. A), em um *blastx* a sequência obtida não teve identidade com nenhuma sequência proteica depositada no GenBank e um *blastn* revelou identidade de 92.17% com retrotransposon de *P. edulis* e, por isso, o sequenciamento não foi continuado. Enquanto isso, todos os clones de PMV2 obtidos das 5 espécies de *Passiflora* investigadas, possuem em torno de 99% de identidade entre si e ~99% com a sequência predita a partir do HTS (Figura 10. B).

Figura 10. Identidade (%) entre nucleotídeos (nt) de sequências de PMV1 e PMV2, par-a-par calculadas com o programa de demarcação de sequência (SDT). **A.** Porcentagens de identidade entre as sequências (nt) de PMV1 amplificadas a partir de amostras de maracujazeiros e sequenciadas por método Sanger juntamente com sequência obtida do HTS. **B.** Porcentagens de identidade entre as sequências (nt) de PMV2 amplificadas a partir de amostras de maracujazeiros e sequenciadas por método Sanger juntamente com sequência obtida do HTS. **B.** Porcentagens de identidade entre as sequências (nt) de PMV2 amplificadas a partir de amostras de maracujazeiros e sequenciadas por método Sanger juntamente com sequência obtida do HTS.



Fonte: autoral (2021)

As sequências de PMV1 obtidas a partir do sequenciamento Sanger, apesar de possuírem uma alta identidade com as sequencias preditas partir dos dados obtidos no HTS, possuem mutações que não permitem a anotação de uma ORF contínua (figura 11 A e B). Observa-se uma longa ORF, no *frame* 3 contendo 1398nt, que codifica uma proteína predita contendo 421aa e que possui identidade com outras RdRp de mitovírus de planta. Ademais, é possível anotar duas pequenas ORF contendo 321nt e 282nt, que codificam peptídeos de 106 e 93aa, respectivamente. Quando realizado um *blastp* utilizando as sequências preditas de aminoácidos não é possível encontrar proteínas semelhantes registradas no *GenBank*. Na tabela 3 está descrito os melhores hits quando realizado um *smartblast* utilizando a sequência predita de aminoácidos de cada ORF de PMV1.

Figura 11. Características moleculares de PMV1. **A.** Representação esquemática da organização genômica da sequência de PMV1 amplificadas a partir do DNA genômico de amostras de maracujazeiros e sequenciadas por método Sanger. **B.** Mutações ao longo do genoma de PMV1. Alinhamento das sequências de PMV1 amplificadas a partir de amostras de maracujazeiros e sequenciadas por método Sanger juntamente com sequência obtida do HTS. Destaques em laranja apontam mutações (substituição ou deleção de bases) locais. Identidade entre sequências é mostrado em barra verde. ORFs anotadas em rosa.



Fonte: autoral (2021).

Embora estes dados difiram dos obtidos no HTS, sequências virais endogenizadas de forma incompleta ou com erros de frames já foram relatados na literatura. Este tipo de erro pode ser gerado durante processos de recombinação gênica que ocorrem naturalmente no organismo ou até mesmo durante o evento de integração (CHIBA et al., 2011; GEUKING et al., 2009; HOHN; ROTHNIE, 2013; KONDO; CHIBA; SUZUKI, 2015). Os pararetrovirus, por exemplo, apesar de possuírem uma transcriptase reversa em seu genoma, não tem um estágio obrigatório de integração no genoma do hospedeiro e quando este evento ocorre, geralmente apenas pequenos pedaços parecem se integrar, não permitindo que a sequência completa seja excisada do genoma da planta (STAGINNUS et al., 2007). Mesmo assim, a integração de sequências virais incompletas nem sempre impede que tais sequências sejam transcritas, como é o caso da sequência de mitovírus endogenizada no mtDNA de *A. thaliana* (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015).

Tabela 3. Caracterização das ORFs de PMV1 endogenizadas em maracujazeiros utilizando a ferramenta smartblast embutida no programa *orffinder* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/). ¹ Identidade (maior valor).

	Smartblast						
ORF	FRAME	Posição (nt)	Descrição do hit	Cobertura	E value (menor valor)	ID1 (%)	Número de acesso no GenBank
1	2	137-457nt	Nenhum match encontrado	-	-	-	-
2	1	703-984nt	Nenhum match encontrado	-	-	-	-
3	3	1167-2432nt	RdRp Arabidopsis thaliana mitovirus	44%	7e-55	55.38%	NP_671802.2

Fonte: autoral (2021).

Além disso, a montagem dos genomas preditos foi realizada a partir do sequenciamento de um pool de amostras. Sendo assim, é possível levantar a hipótese de que, em pelo menos uma amostra, exista uma única ORF completa capaz de codificar uma RdRp completa referente ao PMV1.

Quando alinhada com outras sequências de RdRp de mitovírus, é possível observar o domínio GDD conservado na ORF 3 de PMV1, o que nos leva se perguntar se esta região pode ser transcrita de forma parcial, o que explica a não obtenção de fragmentos referentes a esta sequência na RT-PCR realizada anteriormente (figura 7). Para responder esta pergunta, foram desenhados primers que anelassem numa pequena região da ORF 3 (figura 12. A). Ao realizar RT-PCR com RNA tratado com DNase utilizando amostras já sabidamente positivas para PMV1, foi possível obter um produto em torno de ~ 200 pares de base (pb) de quatro espécies (Figura 12. B). O produto de *P. capparidifolia* foi clonado e sequenciado por método Sanger e possui 100% de identidade com a RdRp predita a partir da ORF 3 de PMV1, sustentando a hipótese de que as sequências de mitovírus integradas em maracujazeiros, embora não tenham mantido um gene completo, são capazes de serem transcritas.

Figura 12. Detecção de transcrito da RdRp de PMV1 por RT-PCR. **A.** Esquematização da organização genômica de PMV1 contendo três ORFs. Primers utilizados para RT-PCR destacados em verde. **B.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%, corado com *sybersafe*) dos fragmentos referentes a RdRp de PMV1 obtidos por RT-PCR com RNA total de *Passiflora* spp. tratado com DNase. Amostras positivas para a RT-PCR foram destacadas em vermelho. Para controle positivo da reação (c+) foi utilizado DNA total de amostra sabiamente positiva. Para controles negativos (c-) foi utilizado água. Marcador 1 star kb ladder Cellco.



Fonte: autoral (2021)

A função de sequências de mitovírus como NERVEs ainda é desconhecida e necessita de estudos aprofundados sobre o assunto. A presença de domínios

conservados de RdRp de mitovírus, incluindo o sítio ativo GDD, na ORF-3 de PMV1 e a detecção do RNA referente a sequência pode sugerir que ela seja capaz de expressar uma proteína funcional. Bruenn, Warner e Yerramsetty (2015) ao estudarem sequências de mitovírus integradas no genoma mitocondrial de *A. thaliana*, sugerem que a conservação dos domínios de RdRp garanta que a sequência transcrita possa expressar uma proteína-NERVE que talvez intefira na propagação de outros mitovírus.

Embora não possua uma ORF única e a notável presença de uma quantidade elevada de códons de parada, ainda assim é possível detectar sequências de PMV2 por meio de RT-PCR em uma gama de espécies de maracujazeiro. É necessário realizar futuros estudos para identificar se as sequências de PMV2 passam por processos após a sua transcrição, como mecanismos de *splicing* ou até mesmo se os erros de *frame* observados na sequência não impedem a expressão de uma proteína funcional.

5.2.2. Aspectos co-evolutivos de passiflora mitovirus-like e espécies de Passiflora

Uma vez integrados, ERVs podem ser transmitidos verticalmente ao longo de gerações e sofrer processos de recombinação gênica (ARNAUD et al., 2007). A endogenização de sequências virais de mitovírus em genomas vegetais pode ter ocorrido junto com o surgimento do grupo de angiospermas (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015).

Estima-se que o gênero *Passiflora* possua em torno de 500 espécies e este é subdivido em quatro subgêneros (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). Para estimar a origem de integração das sequências mitovirais no subgênero *Passiflora,* utilizamos a árvore filogenética do grupo já descrita na literatura (SADER et al., 2019). Observa-se na figura 13 que, com exceção de *P. quadrangularis,* em todas as espécies estudadas neste trabalho houve a integração de pelo menos uma sequência de mitovírus, em algumas havendo a presença tanto de PMV1 como PMV2. Assim como foi estimado anteriormente de que a integração de AtMv em plantas ocorreu antes mesmo do surgimento de plantas vasculares (BRUENN; WARNER; YERRAMSETTY, 2015), é possível que a integração de PMV tenha ocorrido antes mesmo do surgimento do surgimento do subgênero *Passiflora.*

Figura 13. Transferência horizontal de sequências mitovirais no genoma de maracujazeiros (Passiflora spp.). Cladograma reproduzido a partir de dados já publicados (SADER et al., 2019). Espécies de *Passiflora* estudadas neste trabalho estão marcadas em vermelho. Desenhos representam a presença de PMV1 (azul) e PMV2 (laranja).



Fonte: Figura adaptada de Sader e colaboradores (2019).

A descoberta de mitovírus endogenizados em uma gama de espécies do gênero *Passiflora*, e sua capacidade de serem transcritos urge uma questão sobre a origem deste grupo viral. A hipótese mais discutida até então fala sobre seu possível grau de parentesco com a família de bacteriófagos, *Leviviridae* (HILLMAN; CAI, 2013). De acordo com a hipótese, que está relacionada com a teoria da endossimbiose, os mitovírus teriam surgido de uma ramificação deste grupo e perdido o seu capsídeo. A infecção cruzada entre reinos distintos por vírus não é desconhecida e uma gama de vírus consegue utilizar por exemplo, plantas e fungos como hospedeiro (ANDIKA et al., 2017; NERVA et al., 2017; ROOSSINCK, 2019). O estudo e caracterização de novas espécies e isolados de mitovírus associados a plantas pode contribuir para entender melhor a história evolutiva do grupo e suas implicações aos hospedeiros.

5.3. Detecção e caracterização molecular de passiflora mitovirus-like 3 em amostras do campo e do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) – Flor da paixão

Um *contig* de 1309 nucleotídeos (nt) apresentando similaridade com vários membros do gênero *Mitovirus,* montado a partir do sequenciamento do pool PM2BA, foi selecionado para análises e nomeado inicialmente de passiflora mitovirus-like 3 (PMV3). Uma pesquisa blastx foi realizada com a sequência e obtivemos 55,4% de identidade com Humulus lupulus mitovirus 1, sendo possível identificar *motifs* da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) de mitovirus.

A provável sequência completa, contendo 2,663nt foi obtida a partir do mapeamento dos *reads* da biblioteca utilizando a ferramenta "*map to refference*" do *software Geneious R11* (figura 14). PMV3 apresenta uma quantidade relativamente baixa de GC (38,9%), característica comum de membros de *Mitovirus*. Além disso, contém 246nt na região 5'-UTR e uma região de 94nt na 3'-UTR. Assim como outros mitovírus, PMV3 não possui uma cauda poli-A na região 3'. Uma possível estrutura *stem-loop*, também caraterística de mitovírus, pode ser observada na região 5'-UTR do PMV3 com valores de -19.09 kcal/mol. Não foi possível observar estrutura semelhante na região 3'-UTR.

Figura 14. Esquematização da organização genômica de PMV3. **A.** Esquema da organização genômica de PMV3 contendo uma única ORF que codifica uma RdRp deduzida (cinza). A posição do seguimento de DNA amplificado RT-PCR e utilizado como sonda (probe) para o dot blotting é mostrado como um retângulo em preto. **B.** estrutura secundária predita da região 5'-UTR.



Fonte: autoral (2021).

Uma única ORF de senso positivo com 2301nt foi anotada utilizando a ferramenta *find orfs* do *Geneious*. A referida ORF codifica uma proteína predita de 766aa e 87.05kDa, contendo todos os *motifs* de mitovírus (figura 4). A partir da sequência predita, foram desenhadas e montadas 3 combinações de primers para amplificar uma região em torno de 1kb que cobre parte da ORF. Uma RT-PCR foi realizada utilizando *pool* de amostras de RNA total extraídos de acessos da Bahia. Um produto de 960nt foi amplificado a partir do *pool* de amostras PM2BA (figura 15), purificado, clonado e sequenciado por método S*anger*. Um *blastx* foi realizado com a sequência obtida revelando 49% de identidade com Beta vulgaris mitovirus 1 e 99% de identidade com a sequência obtida a partir dos dados do HTS.

Uma sonda foi preparada a partir do produto de PCR descrito acima e com ela foi realizado uma hibridização em *dot blotting de RNA*. Duas membranas de RNA foram preparadas, uma com amostras do campo coletadas na Bahia e uma contendo todas as amostras do BAG. Uma única amostra foi positiva nas amostras da Bahia, referente ao *pool* PM2BA. Em contrapartida, 16 amostras do BAG foram positivas no *dot blotting* (figura 16. A).

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos obtidos por RT-PCR para detecção de PMV3 no pool PM2BA utilizando 3 combinações de primers: **M1** (Mito331F + MV3_936R), **M2** (Mito331F + MV3_1174R) e **M3** (Mito331F + MitoB4331299R).



Fonte: autoral (2021).

A reação de RT-PCR foi repetida utilizando a amostra (40/727) positiva na biblioteca de plantas coletadas na Bahia para confirmação da sequência do PMV3 nessa amostra (Figura 17). Um fragmento de tamanho esperado foi obtido e clonado e dois clones foram sequenciados pelo método Sanger. As sequências dos clones possuem 99% de identidade entre si, com a sequência obtida por PCR a partir do pool e com a sequência predita a partir do HTS. Para descartar a hipótese de que esta seria uma sequência endogenizada, foi realizada uma PCR com o DNA genômico das amostras positivas no *dot blotting* (figura 16. B). Nenhuma das amostras foi positiva, sustentando a hipótese de que este seria um mitovírus replicante e não-endogenizado

Figura 16. Detecção de PMV3 nas amostras do campo coletadas naBahia e amostras do BAG – Flor da Paixão por meio de dot blotting. **A.** Membrana contendo amostras dos de RNA total das amostras que compõe os pools PM1BA e PM2BA referente as amostras coletadas na Bahia – BA. Controle positivo (C+) descrito nos materiais e métodos **B.** membrana contendo amostras coletadas no BAG – Flor da Paixão. **C.** Eletrofrese em gel de agarose (1%, corado com sybersafe, marcador 1 star kb ladder Cellco) de produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico das amostras positivas no dot blotting utilizando a combinação de primers Mito331F + MitoB4331299R. Para controle positivo (C+) foi utilizado o produto de PCR purificado utilizado como sonda para *dot blotting*. Amostras referentes à numeração na membrana descritas nos apêndices.



Fonte: autoral (2021).

Mitovírus aparentam causar infecções crípticas e/ou persistentes em plantas e não tem sido relacionadas por causarem sintomas em plantas (NERVA et al., 2019; VONG et al., 2019). Na realidade, sequências virais tem sido relatados por causarem possíveis benefícios ao hospedeiro (BERTSCH et al., 2009; DA FONSECA et al., 2016; FRANK; FESCHOTTE, 2017; HARTH et al., 2018; HYDER et al., 2013; ROOSSINCK, 2011; SUZUKI et al., 2020; XU et al., 2008). Por exemplo, uma sequência de dsRNA viral é responsável por regular e manter a virulência do fungo *Nectria radicicola* (AHN; LEE, 2001). Mesmo vírus não persistentes ou crípticos já foram descritos por suas relações mutualísticas com seus hospedeiros. Plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas com tobacco mosaic vírus (TMV), Cucumber mosaic virus (CMV), Brome mosaic virus (BMV) ou tobacco rattle virus (TRV), quando comparadas com plantas não infectadas, são capazes de sobreviver por mais tempo após serem submetidas a um estresse hídrico (XU et al., 2008).

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose (1%, corado com sybersafe, marcador 1 star kb ladder Cellco) dos fragmentos obtidos por RT-PCR para detecção de PMV3 na amostra 40/727 por meio de RT-PCR utilizando a combinações de primers **M3** (Mito331F + MitoB4331299R). Para C+ foi utilizado o produto de PCR purificado utilizado como sonda para *dot blotting*



Fonte: autoral (2021).

Embora ainda não tenha havido sucesso nas tentativas de amplificar o genoma completo do passiflora mitovirus-like 3 por meio de métodos convencionais de RT-PCR, os dados obtidos pelo HTS, a comprovação da sequência parcial por RT-PCR e *dot blot*, bem como as análises filogenéticas utilizando os dados de HTS, sugerem que este seja um mitovírus replicante associado à espécie *Passiflora edulis* e não uma contaminação por sequências endogenizadas.

Apesar dos trabalhos que evidenciam relações entre mitovírus e o reino Plantae, são poucos os estudos de caracterização molecular e biológica de mitovírus exógenos em plantas, necessitando portanto de um maior aprofundamento sobre o tema (NERVA et al., 2019; NIBERT et al., 2018; VONG et al., 2019). Este seria, até o atual conhecimento, o primeiro relato de mitovírus infectando maracujazeiros, um importante dado para os estudos de caraterização biológica, aspectos epidemiológicos e moleculares do gênero *Mitovirus*.

6. CONCLUSÕES

Ao investigar a existência de mitovírus associados à maracujazeiros, identificamos a endogenização de sequências mitovirais em uma gama de espécies do subgênero *Passiflora*, indicando que este evento possa ter ocorrido antes mesmo do surgimento do subgênero. As sequências integradas de PMV1 e PMV2 possuem identidade com mitovírus e nossas análises preliminares indicam que estas sequências são capazes de serem transcritas em algumas espécies.

Ao contrário de PMV1 e PMV2, PMV3 não parece ser um elemento endogenizado. Os resultados obtidos evidenciam que a infecção por PMV3 pode se distribuir em diferentes espécies de maracujazeiros. No entanto, não foi possível a obtenção do genoma completo do PMV3 por RT-PCR, necessitando assim de futuros experimentos.

Em suma, aqui apresentamos a primeira evidência de infecção por mitovírus em maracujazeiros (*Passiflora spp.*). A identificação de mitovírus em uma diversidade de plantas e a caracterização destas sequências pode servir de aporte para futuros estudos da evolução do gênero *Mitovirus*. Bem como a caracterização de sequências endogenizadas de vírus pode futuramente auxiliar a compreender os aspectos evolutivos do maracujazeiro.

REFERÊNCIAS

AHN, I.-P.; LEE, Y.-H. A viral double-stranded rna up regulates the fungal virulence of *Nectria radicicola.* **Molecular Plant-Microbe Interactions**®, v. 14, n. 4, p. 496–507, 2001.

AIEWSAKUN, P.; KATZOURAKIS, A. Endogenous viruses: connecting recent and ancient viral evolution. **Virology**, v. 479, n. 480, p. 26–37, 2015.

AKOPYANTS, N. S. et al. A narnavirus in the trypanosomatid protist plant pathogen *Phytomonas serpens*. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, p. 56–57, 2016.

ANDIKA, I. B. et al. Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: A naturally occurring cross-kingdom viral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 46, p. 12267–12272, 2017.

ANDREWS, S. **FastQC:** A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics. 2010

ARNAUD, F. et al. A paradigm for virus-host coevolution: Sequential counteradaptations between endogenous and exogenous retroviruses. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. 1716–1729, 2007.

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.

BARROS, D. R. et al. Comparative analysis of the genomes of two isolates of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts. **Archives of Virology**, v. 156, n. 6, p. 1085–1091, 2011.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. Nature, v. 431, n. 7006, p. 356–363, 2004.

BERTSCH, C. et al. Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. **Biology Direct**, v. 4, n. 21, p. 1–11, 2009.

BOLOGNA, N. G.; VOINNET, O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small rnas in arabidopsis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 473–503, 2014.

BRUENN, J. A.; WARNER, B. E.; YERRAMSETTY, P. Widespread mitovirus sequences in plant genomes. **PeerJ**, v. 3, p. 2–13, 2015.

BUENO, C. J. et al. *Fusarium solani* f. sp. passiflorae : a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. **Plant Pathology**, v. 63, n. 2, p. 382–389, 2014.

CARVALHO, A. B. et al. Birth of a new gene on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 40, p. 12450–12455, 2015.

CAVICHIOLI, J. C. et al. Desenvolvimento e produtividade de maracujazeiro amarelo enxertado na região de Presidente Prudente, SP. **Cultura Agronômica**, v. 26, n. 1, p. 61–68, 2017.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. **Euphytica**, v. 202, n. 3, p. 345–359, 2015.

CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v. 45, p. 1–95, 1997.

CERVI, A. C.; DUNAISKI JUNIOR, A. Passifloraceae do brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Distephana* (Juss.) Killip. **Estudos de Biologia**, v. 26, n. 55, p. 45–67, 2004.

CHIBA, S. et al. A novel bipartite double-stranded RNA Mycovirus from the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biological control. **Journal of Virology**, v. 83, n. 24, p. 12801–12812, 2009.

CHIBA, S. et al. Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. 1–16, 2011.

CHONG, Y.-H. et al. The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as East Asian passiflora virus. **Journal of General Plant Pathology**, v. 84, n. 3, p. 208–220, 2018.

CHU, H.; JO, Y.; CHO, W. K. Evolution of endogenous non-retroviral genes integrated into plant genomes. **Current Plant Biology**, v. 1, p. 55–59, 2014.

COQUEIRO, A. Y.; PEREIRA, J. R. R.; GALANTE, F. Farinha da casca do fruto de *Passiflora edulis* f. flavicarpa Deg (maracujá-amarelo): do potencial terapêutico aos efeitos adversos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 563–569, 2016.

COTTON, J. A. et al. An expressed, endogenous Nodavirus-like element captured by a retrotransposon in the genome of the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Scientific Reports, v. 6, n. 39749, p. 1–8, 2016.

CROCHU, S. et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 7, p. 1971–1980, 2004.

DA FONSECA, G. C. et al. Unusual RNA plant virus integration in the soybean genome leads to the production of small RNAs. **Plant Science**, v. 246, p. 62–69, 2016.

DA SILVA, R. M. et al. Reação de cultivares de maracujazeiro em áreas com fusariose. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, p. 98–102, 2017.

DERISI, J. L. et al. An exploration of ambigrammatic sequences in narnaviruses. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

DINAN, A. M. et al. A case for a negative-strand coding sequence in a group of positive-sense RNA viruses. **Virus Evolution**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2020.

DOYLE, J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13–15, 1990.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá**: o produtor pergunta, a Embrapa responde. 5. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2016.

FONSECA, P. et al. Characterization of a novel mitovirus of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* using genomic and virus–host interaction signatures. **Viruses**, v. 13, n. 9, p. 1–20, 2020.

FRANK, J. A.; FESCHOTTE, C. Co-option of endogenous viral sequences for host cell function. **Current Opinion in Virology**, v. 25, p. 81–89, 2017.

GEUKING, M. B. et al. Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. **Science**, v. 323, n. 5912, p. 393–396, 2009.

GIORIA, R. et al. Limited movement of cucumber mosaic virus (CMV) in yellow passion flower in Brazil. **Plant Pathology**, v. 51, n. 2, p. 127–133, 2002.

GOFF, S. P. Genetics of retroviral integration. **Annual Review of Genetics**, v. 26, n. 1, p. 527–544, 1992.

GOH, C. J. et al. Novel divavirus (the family *Betaflexiviridae*) and mitovirus (the family *Narnaviridae*) species identified in basil (*Ocimum basilicum*). **Acta virologica**, v. 62, n. 03, p. 304–309, 2018.

GUIMARÃES, P. M.; BEZERRA, I. C.; ARAGÃO, F. J. L. Análise de RNA total e RNA interferente pela técnica Northen blot. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. DE C. (Eds.). . Manual de transformação genética de plantas. 2 ed ed. Brasília - DF: Embrapa, 2015. p. 261.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010.

HAMID, M. R. et al. A Novel deltaflexivirus that infects the plant fungal pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*, can be transmitted among host vegetative incompatible strains. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. 295, 2018.

HARTH, J. E. et al. Zucchini yellow mosaic virus infection limits establishment and severity of powdery mildew in wild populations of *Cucurbita pepo*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 792, 13 jun. 2018.

HILLMAN, B. I.; CAI, G. The Family *Narnaviridae*. In: GHABRIAL, S. A. (Ed.). . **Advances in Virus Research**. 1. ed. San Diego: Elsevier, 2013. v. 86p. 149–176.

HILLMAN, B. I.; COHEN, A. B. Mitoviruses (*Mitoviridae*). In: WALTER, O. (Ed.). . **Encyclopedia of Virology**. Amsterdam: Elsevier, 2021. v. 4p. 601–606.

HILLMAN, B. I.; ESTEBAN, R. Family *Narnaviridae*. In: ICTV (Ed.). . Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2012. p. 1055–1060.

Hoang, D., et al. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 2, p. 518–522, 2017.

HOHN, T.; ROTHNIE, H. Plant pararetroviruses: Replication and expression. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 6, p. 621–628, 2013.

HONG, Y. et al. Evolutionary relationships among putative RNA-dependent RNA polymerases encoded by a mitochondrial virus-like RNA in the dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*, by other viruses and virus-like RNAs and by the arabidopsis mitochondrial genome. **Virology**, v. 246, n. 1, p. 158–169, 1998.

HONG, Y.; HUNT, A. G. RNA Polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. **Virology**, v. 226, n. 1, p. 146–151, 1996.

HORIE, M. et al. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. **Nature**, v. 463, n. 7277, p. 84–87, 2010.

HYDER, R. et al. Two viruses of heterobasidion confer beneficial, cryptic or detrimental effects to their hosts in different situations. **Fungal Ecology**, v. 6, n. 5, p. 387–396, 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal - 2019. Disponível em https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#notas-tabela Acesso em 24/07/2021.

JACOBY, R. P. et al. Mitochondrial composition, function and stress response in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 54, n. 11, p. 887–906, 2012.

JOVER-GIL, S. et al. Complete genome sequence of a novel virus, classifiable within the *Potyviridae* family, which infects passion fruit (*Passiflora edulis*). **Archives of Virology**, v. 163, n. 11, p. 3191–3194, 2018.

JUKES, T. H.; OSAWA, S. The genetic code in mitochondria and chloroplasts. **Experientia**, v. 46, n. 11–12, p. 1117–1126, 1990.

KADOWAKI, K.; HALVORSON, H. O. Appearance of a new species of ribonucleic acid during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 105, n. 3, p. 826–830, 1971.

KONDO, H.; CHIBA, S.; SUZUKI, N. Detection and analysis of non-retroviral RNA virus-like elements in plant, fungal, and insect genomes. In: **Rodriguésia**. [s.l.] Instituto de Pesquisas Jardim Botanico do Rio de Janeiro. v. 67p. 73–88, 2015.

LAKSHMAN, D. K.; JIAN, J.; TAVANTZIS, S. M. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6425–6429, 1998.

LIBERATORE, K. L. et al. The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, p. 238–256, 2016.

LIU, H. et al. Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11876–11887, 2010.

MARCON, H. S. et al. Genome-wide analysis of EgEVE_1, a transcriptionally active endogenous viral element associated to small RNAs in Eucalyptus genomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. suppl, p. 217–225, 2017.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 83–91, 2011.

MESA, H. J.; MONTOYA, M. M.; SANCHEZ, P. A. G. Complete genome sequence of a passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) isolate infecting purple passionfruit (*Passiflora edulis* f. edulis). **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 72, n. 1, p. 8643–8654, 2019.

NAVARRO, J. A.; SANCHEZ-NAVARRO, J. A.; PALLAS, V. Key checkpoints in the

movement of plant viruses through the host. 1. ed. Elsevier Inc., 2019.

NERVA, L. et al. Mycoviruses of an endophytic fungus can replicate in plant cells: evolutionary implications. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1908, p. 1–11, 2017.

NERVA, L. et al. Biological and molecular characterization of chenopodium quinoa mitovirus 1 reveals a distinct small RNA response compared to those of cytoplasmic RNA Viruses. **Journal of Virology**, v. 93, n. 7, p. 1–17, 16 jan. 2019.

NIBERT, M. L. Mitovirus UGA (Trp) codon usage parallels that of host mitochondria. **Virology**, v. 507, n. April, p. 96–100,2017.

NIBERT, M. L. et al. Evidence for contemporary plant mitoviruses. **Virology**, v. 518, p. 14–24, 2018.

NOREEN, F. et al. Distinct expression of endogenous petunia vein clearing virus and the DNA transposon dTph1 in two petunia hybrida lines is correlated with differences in histone modification and siRNA production. **The Plant Journal**, v. 50, n. 2, p. 219–229, 2007.

NGUYEN, L. et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v32, p. 268-274, 2015.

OCHWO-SSEMAKULA, M. et al. Characterization and distribution of a *Potyvirus* associated with passion fruit woodiness disease in Uganda. **Plant Disease**, v. 96, n. 5, p. 659–665, 2012.

PARISI, J. J. et al. Pathogenicity and transmission of fungi detected on *Passiflora alata* seeds. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

PERUCH, L. A. M.; COLARICCIO, A.; BATISTA, D. DA C. Controle de doenças do maracujazeiro: situação atual e perspectivas. **Agropecuária Catarinense**, v. 31, n. 1, p. 37–40, 2018.

RAN, H. et al. Co-infection of a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* with a new botybirnavirus and a strain of a mitovirus. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 92, 2016.

ROOSSINCK, M. J. The good viruses: viral mutualistic symbioses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 99-108, 2011.

ROOSSINCK, M. J. Evolutionary and ecological links between plant and fungal viruses. **New Phytologist**, v. 221, n. 1, p. 86–92, 2019.

SADER, M. A. et al. The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L . (Passifloraceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 1, p. 7–21, 2019.

SAHIN, E.; AKATA, I. Complete genome sequence of a novel mitovirus from the ectomycorrhizal fungus *Geopora sumneriana*. **Archives of Virology**, v. 164, n. 11, p. 2853–2857, 2019.

SAMBROOKE, J.; RUSSELL, D. W. Protocol 1: preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: minipreparation. In: SAMBROOOK, J.; RUSSELL, D. W. (Eds.). . **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 132–134, 2001.

SANTOS, V. A. et al. Produção e qualidade de frutos de maracujazeiro-amarelo provenientes do cultivo com mudas em diferentes idades. **Revista de Ciencias Agroveterinarias**, v. 16, n. 1, p. 33–40, 2017.

SHAHI, S. et al. Investigation of host range of and host defense against a mitochondrially replicating mitovirus. **Journal of Virology**, v. 93, n. 6, p. 1–15, 2019.

SHWED, P. S. et al. Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNAdependent RNA polymerases lacking a GDD motif1. **Virology**, v. 296, n. 2, p. 241– 250, 2002.

SILVA, S. R. et al. The mitochondrial genome of the terrestrial carnivorous plant *Utricularia reniformis* (Lentibulariaceae): Structure, comparative analysis and evolutionary landmarks. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. 1-26, 2017.

SIMPSON, J. T. et al. ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. **Genome Research**, v. 19, n. 6, p. 1117–1123, 2009.

SOLÓRZANO, A. et al. Persistent yeast single-stranded RNA viruses exist in vivo as genomic RNA·RNA polymerase complexes in 1:1 stoichiometry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 34, p. 26428–26435, 2000.

SPIEGEL, S. et al. The complete nucleotide sequence of passiflora latent virus and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 1, p. 181–189, 2007.

STAGINNUS, C. et al. Endogenous pararetroviral sequences in tomato (*Solanum lycopersicum*) and related species. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 24, 2007.

SUZUKI, Y. et al. Non-retroviral endogenous viral element limits cognate virus replication in *Aedes aegypti* ovaries. **Current Biology**, v. 30, n. 18, p. 3495- 3506, 2020.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell signalling. **Journal of cell science**, v. 125, n. 4, p. 807-815, 2012.

TANNE, E.; SELA, I. Occurrence of a DNA sequence of a non-retro RNA virus in a host plant genome and its expression: evidence for recombination between viral and host RNAs. **Virology**, v. 332, n. 2, p. 614–622, 2005.

TARNOWSKI, T. L. B.; PLOETZ, R. C. First Report of *Colletotrichum boninense, C. capsici*, and a *Glomerella* sp. as Causes of postharvest anthracnose of passion fruit in Florida. **Plant Disease**, v. 94, n. 6, p. 786–786, 2010.

TURINA, M. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Ourmiavirus*. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 2, p. 129–130, 2017.

VÁZQUEZ, A. L.; ALONSO, J. M. M.; PARRA, F. Mutation analysis of the GDD sequence motif of a calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of Virology**, v. 74, n. 8, p. 3888–3891, 2000.

VIDAL, A. H. et al. First World Report of Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virus Infecting Passionfruit. **Plant Disease**, v. 102, p. 2665-2665, 2018.

VIDAL, A. H. et al. Occurrence of lettuce chlorosis virus in *Passiflora* spp. in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 2, p. 443–447, 2021.

VILLACRESES, J. et al. Deep sequencing reveals the complete genome and

evidence for transcriptional activity of the first virus-like sequences identified in *Aristotelia chilensis* (Maqui Berry). **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1685–1699, 2015.

VONG, M. et al. Beta vulgaris mitovirus 1 in diverse cultivars of beet and chard. **Virus Research**, v. 265, p. 80–87, 2019.

WANG, X.; GILLAM, S. Mutations in the GDD motif of rubella virus putative RNA-Dependent RNA Polymerase affect virus replication. **Virology**, v. 331, n. 2, p. 322– 331, 2001.

WESOLOWSKI, M.; WICKNER, R. B. Two new double-stranded RNA molecules showing non-mendelian inheritance and heat inducibility in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, n. 1, p. 181–187, 1984.

WU, M. et al. Genome characterization of a debilitation-associated mitovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Virology**, v. 406, n. 1, p. 117–126, 2010.

XU, P. et al. Virus infection improves drought tolerance. **New Phytologist**, v. 180, n. 4, p. 911–921, 2008.

XU, Z. et al. A mitovirus related to plant mitochondrial gene confers hypovirulence on the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Virus Research**, v. 197, p. 127–136, 2015.

APÊNDICES

I. Pools de *Passiflora spp*. identificados por acesso, espécie e sintomas apresentados durante a coleta

	-	Pool B/	AG 1
	Amostra	NOME CIENTÍFICO	SINTOMAS
1	1592	Passiflora. alata Curtis, 1788	mosaico severo, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
2	1595	Passiflora fissurosa M.A.D.Souza, 2011	mosaico leve, deformações na superfície das folhas
3	1596	Passiflora alata Curtis, 1788	mosaico severo e deformações no limbo foliar
4	1597	Passiflora alata Curtis, 1788	mosaico
5	1598	Passifora coccinea X Passiflora setacea	leve mosaico
6	1600	Passiflora. mucronata Lam., 1789	mosaico leve, deformações na superfície das folhas (semelhantes a bolhas)
7	1602	Passiflora fissurosa M.A.D.Souza, 2011	mosaico severo, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
8	1605	Passiflora coccinea Aubl. 1775	mosaico leve e sem deformações foliares
9	1613	Não listado	
10	1617	Passiflora quadriglandulosa Rodschied	mosaico intenso
11	1620	Passiflora biflora Lam., 1789	mosaico
12	1621	'BRS Rosea Púrpura' (P. incarnata x P. quadrifaria x P. setacea)	leve mosaico
13	1627	Passiflora tholozanii Sacco, 1967	leve mosaico
14	1632	'BRS Estrela do Cerrado' (Passiflora coccínea x P. setacea)	mosaico leve e deformações do limbo foliar
15	1633	'BRS Roseflora'(Passiflora coccínea x P. setácea x P. setácea)	mosaico leve e deformações na superfície das folhas
16	1636	Passiflora auriculata Kunth., 1817	mosaico leve
17	1638	Passiflora tholozanii Sacco, 1967	mosaico leve e deformações na superfície das folhas
18	1641	Passiflora actinia Hook, 1843	mosaico leve
19	1642	Passiflora auriculata Kunth., 1817	mosaico intenso, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
20	1643	Passiflora alata Curtis, 1788	mosaico
21	1646	Passiflora ambigua Hemsl., 1902	mosaico severo, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar

		Pool E	BAG 2
	Amostra	NOME CIENTÍFICO	SINTOMAS
22	1591	Passiflora eichleriana Mast., 1872 X P. gibertiN.E.Br, 1894	mosaico leve, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
23	1594	Passiflora capparidifolia Killip, 1924	mosaico leve, deformações na superfície das folhas
24	1601	Passiflora nitida Kunth, 1817	mosaico severo, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
25	1604	Passiflora capparidifolia Killip, 1924	mosaico leve, deformações na superfície das folhas (semelhantes a bolhas)
26	1606	Passiflora vitifolia Kunth, 1817	mosaico severo e deformações do limbo foliar
27	1608	Passiflora spp. Identificar	mosaico severo e deformações do limbo foliar
28	1614	Passiflora edulis	mosaico leve e deformacoes do limbo foliar
29	1616	Passiflora watsoniana Mast., 1886	mosaico leve
30	1618	Passiflora cerradensis Sacco	sem sintomas (caramujo)
31	1623	Passiflora elegans Mast., 1872	mosaico
32	1630	Passiflora caerulea L. 1753	mosaico leve e deformações do limbo foliar
33	1635	Passiflora triloba Ruiz & Pav. ex DC., 1828	mosaico leve
34	1637	Passiflora hatschbachii Cervi, 1994	mosaico leve
35	1639	Passiflora edulis Sims, 1818	mosaico, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
36	1640	Passiflora sp.	sem sintomas
37	1644	Passiflora eichleriana X Passiflora gibertii	mosaico intenso e deformações na superfície das folhas
38	1645	Passiflora edulis Sims, 1818	mosaico leve e deformações na superfície das folhas

		Pool	BAG 3
	Amostra	NOME CIENTÍFICO	SINTOMAS
39	1590	Passiflora maliformis Vell., 1831	mosaico leve, deformações na superfície das folhas
40	1593	Passiflora galbana Mast., 1896	mosaico
41	1599	Passiflora cacao Bernacci & M.M.Souza, 2012	mosaico severo e deformações no limbo foliar
42	1603	Passiflora quadrangularis Triana & Planch, 1873	mosaico severo, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
43	1607	Passiflora incarnata L., 1953	mosaico leve e deformações foliares
44	1609	Passiflora mucronata Lam.	mosaico leve, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
45	1610	Passiflora galbana Mast., 1896	mosaico leve e deformacoes do limbo foliar
46	1611	Passiflora malacophylla Mast., 1872	mosaico leve e deformações na superfície das folhas
47	1612	Passiflora suberosa L., 1753	mosaico leve
48	1615	Passiflora serratodigitata L., 1753	mosaico leve, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
49	1619	Passiflora ferruginea Mast., 1872	leve mosaico
50	1622	Passiflora riparia Mart. ex Mast., 1872	mosaico leve e deformações do limbo foliar
51	1624	Passiflora riparia Mart. ex Mast., 1872	mosaico leve, deformações na superfície das folhas e do limbo foliar
52	1625	Passiflora hatschbachii Cervi, 1994	mosaico leve e deformações na superfície das folhas
53	1626	Passiflora gardneri Mast., 1872	mosaico severo e deformações do limbo foliar
54	1628	Passiflora foetida L., 1753 DF	leve mosaico
55	1631	Passiflora subrotunda Mast., 1872	mosaico leve e deformações na superfície das folhas
56	1647	Passiflora racemosa Brot., 1818	mosaico severo e deformações na superfície das folhas
57	1648	Passiflora rufa Feuillet & J.M.MacDougal, 2008	sem sintomas
58	1649	Não listada	mosaico leve e deformações na superfície das folhas

	POOL – PM1BA (Amostras do Campo, Bahia)				
	Amostra	Espécie	Local de coleta- Bahia	Sintomas	
1	500	P. edulis	Marcionilio de Souza	Encarquilamento, bolhosidade, mosaico	
2	501	P. edulis	Marcionilio de Souza	Mosaico leve	
3	502	P. edulis	Marcionilio de Souza	Mosaico leve	
4	503	P. edulis	Marcionilio de Souza	Mosaico e clareamento de nervura	
5	504	P. edulis	Marcionilio de Souza	Mosaico, manchas amarelas, bolhosidade, encarquilhamento, deformação foliar	
6	505	P. edulis	Marcionilio de Souza	Mosaico, manchas amarelas e deformação foliar	
7	521	P. edulis	Marcionilio de Souza	Mosaico, bolhosidade, e deformação foliar	
8	557	P. edulis	Seabra	Mosaico, clorose, deformação foliar	
9	558	P. edulis	Seabra	Mosaico, clorose, deformação foliar	
10	559	P. edulis	Seabra	Mosaico, clorose, deformação foliar	
11	560	P. edulis	Seabra	Mosaico, clorose, deformação foliar	
12	561	P. edulis	Seabra	Mosaico, clorose, deformação foliar	
13	562	P. edulis	Seabra	Mosaico, clorose, deformação foliar	
14	563	P. edulis	Seabra	Mosaico, clorose, deformação foliar	
15	564	P. edulis	Seabra	Mosaico, clorose, deformação foliar	
16	629	P. edulis	Livramento de Nossa Senhora	Mosaico, Blistering, deformação foliar	
17	630	P. edulis	Livramento de Nossa Senhora	deformação foliar	
18	798	P. edulis	Morro do Chapéu	Mosaico, bolhosidade	
19	799	P. edulis	Morro do Chapéu	Mosaico	
20	594	P. edulis	Dom Basílio	Amarelamento, deformação foliar (Begoma)	
21	595	P. edulis	Dom Basílio	Mosaico (White damage?)	
22	596	P. edulis	Dom Basílio	Mosaic+ veinbranding	
23	597	P. edulis	Dom Basílio	Mosaico	

24	598	P. edulis	Dom Basílio	Mosaico
25	599	P. edulis	Dom Basílio	Dano por inseto
26	600	P. edulis	Dom Basílio	Deformação doliar+Dano por inseto
27	601	P. edulis	Dom Basílio	Deformação doliar+mosaico, amarelamento
28	602	P. edulis	Dom Basílio	Dano por inseto+ mosaico leve
29	603	P. edulis	Dom Basílio	Pontos amarelos+ deformação foliar
30	611	P. edulis	Dom Basílio	Amarelamento, deformação foliar + mosaico

POOL – PM2BA (Amostras do Campo, Bahia)				
	Amostra	Espécie	Local de coleta- Bahia	Sintomas
31	523	P. cincinata	Lençois	Mosaico, deformação foliar em algumas folhas
32	524	P. cincinata	Lençois	Mosaico
33	525	P. cincinata	Lençois	Mosaico
34	716	P edulis	Lençois	Yellow vein
35	721	P. edulis	Lençois	Pinta verde, mosaico, bolhosidade
36	723	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
37	724	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
38	725	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
39	726	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
40	727	P. edulis	Lençois	mosaic + vein banding
41	728	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
42	729	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
43	730	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
44	731	P. alata	Lençois	Bolhosidade, e mosaico
45	732	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
46	733	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
47	734	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, arroxeamento foliar

48	736	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar
49	737	P. edulis	Lençois	mosaic+ bolhosidade+ yellow blot
50	738	P. alata	Lençois	mosaic+ bolhosidade+ vein bading
51	739	P. edulis	Lençois	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
52	576	P. edulis	Jussiape	Faixa de nervura, bronzeamento, bolhosidade
53	577	P. edulis	Jussiape	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico, manchas amare- las
54	578	P. edulis	Jussiape	Bolhosidade, deformação foliar e dos frutos
55	579	P. edulis	Jussiape	Bolhosidade, deformação foliar e clareamento das nervuras
56	580	P. edulis	Jussiape	clareamento das nervuras e nercrose
57	581	P. edulis	Jussiape	Mosaico, deformação foliar e amareleciemtno
58	582	P. edulis	Jussiape	Mosaico, deformação foliar e amareleciemtno
59	583	P. edulis	Jussiape	Bolhosidade, deformação foliar e mosaico
60	584	P. edulis	Jussiape	Mosaico leve e necrose

II. Sequências utilizadas para análises filogenéticas e seus números de acesso no GenBank

Acesso GenBank Vírus YP 009270635.1 Alternaria arborescens mitovirus 1 YP 009165597.1 Binucleate rhizoctonia mitovirus k1 YP 002284334.2 Botrytis cinerea mitovirus 1 YP 009182160.1 Botrytis cinerea mitovirus 2 YP 009182161.1 Botrytis cinerea mitovirus 3 YP 009182163.1 Botrytis cinerea mitovirus 4 YP 009551903.1 Chenopodium quinoa mitovirus 1 Clitocybe odora virus YP 005352912.1 Cronartium ribicola mitovirus 1 YP 009259369.1 Cronartium ribicola mitovirus 2 YP 009259481.1 YP 009259482.1 Cronartium ribicola mitovirus 3 Cronartium ribicola mitovirus 4 YP 009259483.1 YP 009259487.1 Cronartium ribicola mitovirus 5 NP 660174.1 Cryphonectria mitovirus 1 Erysiphe necator mitovirus 1 YP 009465715.1 YP 009465716.1 Erysiphe necator mitovirus 2 YP 009465717.1 Erysiphe necator mitovirus 3 Fusarium coeruleum mitovirus 1 YP 009126873.1 YP 009126872.1 Fusarium globosum mitovirus 1 YP 009272898.1 Fusarium poae mitovirus 1 YP 009272899.1 Fusarium poae mitovirus 2 YP 009272900.1 Fusarium poae mitovirus 3 YP 009272901.1 Fusarium poae mitovirus 4 Gigaspora margarita mitovirus 1 YP 009553175.1 YP 077184.1 Gremmeniella abietina mitochondrial rna virus s2 YP 009553599.1 Leptosphaeria biglobosa mitovirus 1 YP 009408146.1 Ocimum basilicum rna virus 2 Ophiostoma mitovirus 3a NP 660176.1 Ophiostoma mitovirus 4 NP_660179.1 NP_660180.1 **Ophiostoma mitovirus 5** NP 660181.1 **Ophiostoma mitovirus 6** Rhizoctonia mitovirus 1 YP 009551966.1 YP 009249807.1 Rhizoctonia oryzae-sativae mitovirus 1 Rhizophagus diaphanum mitovirus 1 YP 009553678.1 Rhizophagus irregularis mitovirus 1 YP 009552077.1 Rhizophagus sp. Rf1 mitovirus YP 009552787.1 Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 1 YP 009121785.1 YP 009551566.1 Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 2

YP_009182164.1	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 3
YP_009009144.1	Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 6
YP_002822229.1	Thielaviopsis basicola mitovirus
YP_004564622.1	Tuber aestivum mitovirus
DAB41740.1	Ambrosia artemisiifolia mitovirus 1
DAB41741.1	Azolla filiculoides mitovirus 1
DAC76744.1	Beta vulgaris mitovirus 1
QQO58809.1	Cannabis sativa mitovirus 1
DAB41747.1	Dahlia pinnata mitovirus 1
DAB41748.1	Erigeron breviscapus mitovirus 1
DAB41749.1	Humulus lupulus mitovirus 1
YP_009408146.1	Ocimum basilicum rna virus 2
DAB41745.1	Oxybasis rubra mitovirus 1
QVU28731.1	Paris mitovirus 1
DAB41744.1	Petunia exserta mitovirus 1
DAB41743.1	Solanum chacoense mitovirus 1
AZT88620.1	Aspergillus neoniger ourmia-like virus 1
QDB75001.1	Cladosporium uredinicola ourmiavirus 1
QDB75002.1	Cladosporium uredinicola ourmiavirus 2
QKI79940.1	Erysiphe necator associated ourmia-like virus 111
QKI29250.1	Kummerowia striata ourmiavirus
QDW80874.1	Magnaporthe oryzae ourmia-like virus 4
QOE77939.1	Sclerotinia sclerotiorum ourmia-like virus 4
NP_660178.1	Saccharomyces 20s rna narnavirus
NP_660177.1	Saccharomyces 23s rna narnavirus
YP_009553325.1	Leptomonas seymouri narna-like virus 1
BCH36659.1	Magnaporthe oryzae narnavirus 2
YP_009388498.1	Neofusicoccum luteum mitovirus 1
ARO49434.1	Neofusicoccum luteum mitovirus 1
AGW51766.2	Ochlerotatus-associated narna-like virus 1
YP_009345044.1	Phomopsis longicolla rna virus 1
YP_009241365.1	Phytophthora infestans rna virus 4
QHQ74301.1	Plasmodium vivax narna-like virus 1
DAD49837.1	Lutzomyia longipalpis mitovirus 1
YP_009553587.1	Gigaspora margarita mitovirus 2
YP_009551960.1	Gigaspora margarita mitovirus 3
YP_009551961.1	Gigaspora margarita mitovirus 4
YP_009553263.1	Rhizophagus diaphanum mitovirus 2

Fonte: Autoral (2021)

_

III. Controle de DNase: Eletroforese em Gel de agarose (1%, corado com sybersafe) dos fragmentos obitidos por meio PCR utilizando combinação de primers Bag3_Mito2-2_379F + Bag3_Mito2-2_1076R. RT = transcripatase reversa. RNA - RT = RNA sem realizar reação de transcriptase reversa. Para o controle positivo (C+) foi utilizado DNA total de amostra sabiamente positiva.



Fonte: autoral (2021)
ANEXOS

I. Protocolo de preparo de Meio Luria-Bertani (LB)

Meio LB líquido:

- 10g de Triptona;
- 5g de Extrato de levedura;
- 10g de Cloreto de Sódio;
- Ajustar o volume para 1L com H₂O destilada (q.s.p.);
- Autoclavar.

Meio LB sólido:

- Para cada 1L de meio LB líquido, adicionar 16g de ágar bacteriológico;
- Autoclavar.

Fonte: (SAMBROOKE; RUSSELL, 2001)

II. Soluções para Miniprep

Solução I

- 25mM Tris-CI (pH 8.0)
- 10mM EDTA (pH 8.0)
- Autoclavar e armazenar a 4ºC

Solução II

- 0.2N NaOH (diluição fresca do estoque 10N)
- 1% (w/v) SDS
- Armazenar em temperatura ambiente

Solução III

- 60mL de acetato de potássio (5M)
- 11,5mL de ácido acético glacial
- 28,5mL de água autoclavada
- Armazenar a 4ºC

Fonte: (SAMBROOKE; RUSSELL, 2001)

Tampão CTAB III.

- 2% (p/v) CTAB 1,4M NaCl
- 100mM Tris-HCl
- 2% (v/v) β-mercaptoetanol
 20mM EDTA

Adaptado de Doyle e Doyle (1987).

Solução TE IV.

- 10mM Tris
- 1mM EDTA
- dH₂0 autoclavada (q.s.p. 1L)

V. Resumo publicado nos Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul (2020).

RESUMO - AMBIENTAL

EVIDENCES OF MITOVIRUS-DERIVED NON-RETROVIRAL ENDOGENOUS RNA VIRAL ELEMENTS (NERVE) IN PASSIFLORA SPP.

Yam De Sousa Santos (yamssantos@gmail.com) Andreza Henrique Vidal (andrezactg@hotmail.com) Emanuel Felipe Medeiros Abreu (emanuel.abreu@embrapa.br) Isadora Nogueira (isadora.nogueira@inovagenetica.com.br) Fabio Gelape Faleiro (fabio.faleiro@embrapa.br) Cristiano Lacorte (cristiano.lacorte@embrapa.br) Fernando L (flucasmelo@gmail.com) Magnólia De Araújo Campos (profamagnoliaufcg@gmail.com) Arvind Varsani (arvind.varsani@asu.edu) Simone Da Graça Ribeiro (simone.ribeiro@embrapa.br)

Mitoviruses consist of a group of ssRNA (+) viruses with a single ORF encoding a deduced viral RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp) protein and has no capsid. These viruses belong to the Narnaviridae family and infect mitochondria of phytopathogenic fungi and were recently detected infecting plants. Although a DNA stage in the replication cycle or genome integration is not required, mitovirus-derived sequences can be detected in host mitochondrial and nuclear genomes of plants. In some cases, these mitovirus-derived sequences are capable to be transcribed. Passion fruit (Passiflora spp.) is an economically important crop for many tropical and sub-tropical countries around the world and the production is affected by many diseases caused by viruses. However, there are no reports of mitoviruses associated with Passiflora spp.. The aim of this study was to identify mitoviruses associated with passion flower plants by molecular techniques. Double-strand RNA (dsRNA) extracted from 22 accessions of Passiflora spp. plants with virus-like symptoms was sequenced using Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing system. Raw reads were de novo assembled and 23 contigs with high similarity with plant mitoviruses were identified. A 5,5 kb contig (named as Passiflora mitovirus-like PMV) showing a single ORF with mitovirus RdRp motifs was selected for further studies. Oligonucleotides were synthetized for PCR and RT-PCR and used to amplify this mitovirus-derived fragment from both RNA and DNA extracted from passion flower leaves. A 926 nt fragment was amplified from both RNA and DNA from 13 accessions of Passiflora spp. (P. galbana; P. cacao; P. quadrangularis; P. incarnata; P. mucronate; P. malacophylla; P. serratodigitata; P. ferruginea; P. hatschbachii; P. gardneri and P. subrotunda), evidencing a possible endogenization or horizontal gene transfer (HGT). The mitovirusderived fragments from P. galbana and P. maliformis were cloned and Sanger sequenced. PMV clones share 54% RdRp amino acid identity with chenopodium guinoa mitovirus 1 and phylogenetic analysis of the predicted RdRp with plant and fungi mitoviruses shows that they cluster with other plant mitoviruses. Overall, we present here the first evidence of mitovirus infection in Passiflora spp. as NERVEs and the recovery of mitovirus-derived fragments from RNA samples indicates that PMV is capable to be transcribed.

Financial Support: This study was supported by grants from Embrapa, CNPq and FAPDF. Y. S. Santos and A. H. Vidal are supported by a scholarship form CAPES.

SANTOS, Yam de Sousa et al.. Evidences of mitovirus-derived non-retroviral endogenous RNA viral elements (NERVE) in Passiflora spp... In: Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul. Anais... Porto Alegre (RS)Online, 2020. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/cbv/297233-EVIDENCES-OF-MITOVIRUS-DERIVED-NON-RETRO-VIRAL-ENDOGENOUS-RNA-VIRAL-ELEMENTS-(NERVE)-IN-PASSIFLORA-SPP>. Acesso em 27/07/2021.

 VI. Resumo premiado com título de menção honrosa na categoria "vegetal – pós graduação" no XXV Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (2020).

EVIDÊNCIAS DE MITOVIRUS EM ACESSOS DE Passiflora SPP COMO ELEMENTOS ENDOGENIZADOS DE RNA-NÃO-RETROVIRAL

<u>Yam De Sousa Santos</u> Andreza Henrique Vidal Emanuel Felipe Medeiros Abreu Isadora Nogueira Fabio Gelape Faleiro Cristiano Lacorte Fernando L Magnólia De Araújo Campos Arvind Varsani Simone Da Graça Ribeiro

O maracujazeiro (Passiflora spp), pertence à família Passifloracea e possui grande importância econômica. Sua produção pode ser afetada por uma grande variedade de doenças causadas por vírus. O gênero Mitovirus, da família Narnaviridae, compreende vírus de ssRNA não encapsidados caracterizados por possuírem uma única ORF capaz de codificar uma RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP) e por localizar-se no interior de mitocôndrias de fungos. Entretanto, vírus deste gênero tem sido identificados em plantas, tanto replicante, como na forma de elementos endogenizados de RNA-não-retroviral, embora não possuam estágio obrigatório de DNA, tampouco uma transcriptase reversa em seu genoma. Até o presente momento, não há estudos relacionados a infecções causadas por mitovírus em maracujazeiros. Desta forma o objetivo deste estudo foi identificar mitovírus em acessos de Passiflora spp. através de técnicas moleculares. RNAs de dupla fita (dsRNA) extraídos de 22 acessos de Passiflora spp. do "BAG Flor da Paixão" foram seguenciados em plataforma Illumina HiSeq 2500. Vinte e três contigs com alta similaridade com outros mitovirus de plantas foram montados a partir dos reads obtidos no sequenciamento. Um contig de 5,5kb (nomeado Passiflora mitovirus-like, PMV) contendo uma única ORF com domínios conservados de RdRp de mitovirus foi selecionado para análises. Primers foram sintetizados para PCR e RT-PCR e um fragmento de 926nt foi amplificado a partir do RNA e do DNA extraído de 13 acessos diferentes de Passiflora spp. Fragmentos de mitovirus-like dos acessos de P. galbana e P. maliformis foram clonados e sequenciados pelo método de Sanger. Os clones de PMV possuem 54% de identidade com chenopodium quinoa mitovirus 1 e análises filogenéticas de sua ORF predita mostra um agrupamento com outros mitovirus de planta. Em suma, este é o primeiro relato de evidências de infecção por mitovirus em Passiflora spp. como elemento endogenizados e a detecção destes fragmentos em amostras de RNA indicam que PMV é transcrito pela planta.



SANTOS, Yam de Sousa et al.. Evidências de mitovirus em acessos de *Passiflora* spp como elementos endogenizados de RNA-não-retroviral... In: Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF). **Anais**: resumos dos trabalhos / XXV Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021. Disponível em: < https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132441/anais-resumos-dos-trabalhos> Acesso em 27/07/2021