

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARCELO HENRIQUE SAVOLDI PICOLI

Identificação e caracterização genômica de um isolado do  
*Bean rugose mosaic virus*

Maringá, PR  
2015

MARCELO HENRIQUE SAVOLDI PICOLI

Identificação e caracterização genômica de um isolado do  
*Bean rugose mosaic virus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Proteção de Plantas

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto

Maringá, PR

2015

P634i **PICOLI**, Marcelo Henrique Savoldi

**Identificação e Caracterização Genômica de um Isolado do Bean rugose mosaic virus.** Marcelo Henrique Savoldi Picoli. Maringá-Pr. UEM-Universidade Estadual de Maringá, 2015.

56p.

Contém Tabelas e Figuras

Doutorado **em Agronomia**

Área de Concentração: Proteção de Plantas

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto

1. Sequenciamento Completo. 2. Comovirus. 3. Fabaceae. UEM-Universidade Estadual de Maringá. I.Título.

CDD 22<sup>a</sup> Ed. 630  
NBR 12899 - AACR/2

MARCELO HENRIQUE SAVOLDI PICOLI

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE UM  
ISOLADO DO *Bean rugose mosaic virus*

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, na área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor

APROVADA em 03 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. **Dauri José Tessmann**

Presidente

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Adriana Gonela**

Membro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Ione Parra Barbosa-Tesman**

Membro

---

Prof. Dr. **William Mario de Carvalho Nunes**

Membro

---

Prof. Dr. **Tatsuya Nagata**

Membro

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde e sabedoria, e pela graça de ser abençoado pelo Espírito Santo, que sempre me conduziu por bons caminhos.

Aos meus pais, Elizeu e Irene e aos meus irmãos Bianca e Paulo Roberto, pelo amor incondicional, apoio, e dedicação sempre motivadores.

Ao Professor Dr. Eliezer Rodrigues de Souto, pela orientação, incentivo e dedicação durante o curso de Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, à Universidade Estadual de Maringá e seus professores e funcionários pela formação profissional e pela assistência necessária para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante o curso.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Dr. Álvaro Manuel Rodrigues Almeida, pesquisador da EMBRAPA Soja, pela orientação e apoio técnico, essenciais para a realização de parte do trabalho, bem como a todos os funcionários que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste projeto.

À TMG – Tropical Melhoramento e Genética, e todos os seus funcionários, em especial aos pesquisadores Doutores Alexandre Garcia, Arlindo Harada, Éberson Calvo e Romeu Kill, pelo incentivo à pesquisa, apoio e orientação.

Ao Professor Dr. Elliot W. Kitajima, pela colaboração nos trabalhos de microscopia eletrônica realizados na ESALQ/USP.

A todos os meus amigos e familiares, especialmente aos colegas Patrícia, Jaqueline, Cassiele, Taise, Betty, Antônio Augusto, Hugo, Gislaine, Sandra, Rafael, Simone, Taylon, Rosângela, Júlio, Valter, que sempre me apoiaram e incentivaram no decorrer dos experimentos.

## BIOGRAFIA

MARCELO HENRIQUE SAVOLDI PICOLI, nascido em Maringá, PR, aos 18 dias do mês de setembro de 1986, é filho de Irene Ivone Savoldi Picoli e Elizeu Picoli.

Em janeiro de 2009, graduou-se no curso de Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

Em março de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração de Proteção de Plantas, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia na Universidade Estadual de Maringá, defendendo dissertação em fevereiro de 2011.

Em março de 2011 iniciou o curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração de Proteção de Plantas, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia na Universidade Estadual de Maringá.

# Identificação e caracterização genômica de um isolado do *Bean rugose mosaic virus*

## RESUMO

O *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) é considerado um membro do gênero *Comovirus* pertencente à família *Comoviridae*, e que infecta espécies de leguminosas. O genoma completo deste vírus ainda não havia sido sequenciado. Os comovírus possuem duas fitas simples de RNA de senso positivo (RNA1 e RNA2), que são encapsulados separadamente em vírions esféricos. Um isolado viral inoculado mecanicamente em feijoeiro cultivar Rio Tibagi, induziu sintomas de mosaico, associados à formação de bolhas e deformação foliar. Testes de ELISA indireto com anticorpos para comovírus de leguminosas foram positivos, e análises de microscopia eletrônica de transmissão revelaram partículas icosaédricas de aproximadamente 28 nm de diâmetro em amostras foliares infectadas. Nos testes de transmissão com *Diabrotica speciosa*, a eficiência de transmissão foi de 40%. Análises de transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) sugeriram que o patógeno seria um comovírus, o que foi confirmado por análises de partes do genoma sequenciadas. Das 29 cultivares de soja, 11 apresentaram sintomas, e das 22 cultivares de feijão, 17 desenvolveram sintomas quando inoculadas com o vírus. O genoma completo do isolado viral foi sequenciado, sendo constituído de dois RNAs poliadenilados. O RNA1 é composto de 5909 nucleotídeos, codificando um único polipeptídeo com 1856 aminoácidos, e massa molecular estimada em 210 kDa. A poliproteína do RNA1 contém os polipeptídeos necessários para a replicação viral e para os processos proteolíticos. O RNA2, com 3644 nucleotídeos, codifica um único polipeptídeo de 1097 aminoácidos contendo uma proteína de movimento viral, e proteínas dos capsídeos. As sequências de nucleotídeos completas dos capsídeos virais (*Small coat protein* e *Large coat protein*) apresentaram identidade máxima de 54 e 61% com as sequências de outras espécies de *Comovirus*. Este isolado foi identificado como BRMV-Paraná, e com base nas sequências obtidas e nos critérios estabelecidos pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), propomos que o BRMV seja considerado uma espécie distinta e definitiva do gênero *Comovirus*.

**Palavras-chave:** Sequenciamento completo, *Comovirus*, Fabaceae.

Identification and genomic characterization of a  
*Bean rugose mosaic virus* isolate

**ABSTRACT**

The *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) is a member of the genus *Comovirus* of the family *Comoviridae*, that infects leguminous plants. The complete genome of this virus had not yet been sequenced. Comoviruses have two positive, single stranded genomic RNAs (RNA1 and RNA2), which are encapsidated into separate spherical virions. A virus isolate was mechanically inoculated in common bean cultivar Rio Tibagi, inducing symptoms of mosaic, blistering and leaf distortion. Indirect ELISA tests with antibodies for leguminous comoviruses were positives, and electron microscopic analysis revealed icosahedral particles approximately 28 nm in diameter in infected leaf samples. The virus transmission efficiency of *Diabrotica speciosa* was 40%. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis suggested the pathogen was a comovirus, as was confirmed after genomic partial sequencing. Eleven out of 29 soybean cultivars, and 17 out of 22 common bean cultivars showed symptoms after virus inoculation. The virus complete genome was sequenced consisting of two polyadenylated RNAs. RNA1 is 5909 nucleotides long encoding a single polypeptide of 1856 amino acids, with an estimated molecular weight of 210 kDa. The RNA1 polyprotein contains the polypeptides for viral replication and proteolytic processing. RNA2, that is 3644 nucleotides long, codes for a single 1097 amino acids polypeptide containing the movement protein and coat proteins. The complete nucleotide sequence of viral capsids (*Small coat protein* and *Large coat protein*) showed maximum identity of 54 and 61% with sequences from other *Comovirus* species. The isolate was identified as BRMV-Paraná, and based on sequencing data and on ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) criteria, we propose BRMV as a distinct and definitive species in the *Comovirus* genus.

**Key-words:** Complete sequencing, *Comovirus*, Fabaceae.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	<i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR, para identificação do isolado viral em estudo.....	17
<b>Tabela 2</b>	Gama de hospedeiras do isolado viral em cultivares de soja ( <i>Glycine max</i> ).....	29
<b>Tabela 3</b>	Gama de hospedeiras do isolado viral em cultivares de feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	32
<b>Tabela 4</b>	Dados referentes à montagem do genoma do vírus após sequenciamento.....	36
<b>Tabela 5</b>	Identidade na sequência de aminoácidos (%) entre as proteínas do BRMV e de outras espécies do gênero <i>Comovirus</i> .....	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Organização genômica do CPMV. ORFs nas moléculas de RNA são indicadas por barras abertas. As posições dos nucleotídeos nos códons de início e de parada são mostrados acima das ORFs, e os sítios de clivagem nas poliproteínas são mostrados abaixo. Abreviações: co-pro, cofator protease; ntb, proteína de ligação de nucleotídeo; pro, protease; pol, polimerase; cr, cofator de replicação RNA2; mp, proteína de movimento; LCP, proteína da capa maior; SCP, proteína da capa menor (CARETTE, et al., 2002).....	6
<b>Figura 2</b>	Sintomas de infecção do isolado viral em estudo em feijão cultivar Rio Tibagi, após 30 dias de inoculação com tampão fosfato de sódio. (A), (B) e (C) Sintomas de mosaico, formação de bolhas e deformação foliar; (D) Diminuição do porte da planta infectada (esquerda), comparada com uma planta sadia (direita), com a mesma idade.....	23
<b>Figura 3</b>	Gráfico do resultado do teste de ELISA indireto utilizando “antissoro Vírus do mosaico em desenho” .....	24
<b>Figura 4</b>	Gráfico do resultado do teste de ELISA indireto utilizando “antissoro Vírus do mosaico rugoso” .....	25
<b>Figura 5</b>	Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão de preparações de folhas de feijão da cultivar Rio Tibagi infectadas, por meio do método de cortes ultrafinos, mostrando prováveis partículas virais (seta) (Realizado pelo Prof. Dr. E. W. Kitajima)...	26
<b>Figura 6</b>	Eletroforese em gel de agarose do produto de RT-PCR utilizando plantas infectadas com o isolado viral em estudo. Os <i>primers</i> “BRMV RNA1” amplificaram fragmentos de 210 pb (A) e (B), e os <i>primers</i> “BRMV RNA2” amplificaram fragmentos de 180 pb (C) e (D). M: Marcador molecular DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder) (Roche®, Suíça).....	27
<b>Figura 7</b>	Eletroforese em gel de agarose do produto de RT-PCR utilizando os <i>primers</i> “ComovirusRNA1” com plantas infectadas com BRMV (B) e (E); plantas sadias (C) e (D); e branco (A). M: Marcador molecular DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder) (Roche®, Suíça).....	28
<b>Figura 8</b>	Gráfico do resultado do teste de ELISA indireto em cultivares de soja inoculadas com o isolado viral, utilizando o “antissoro Vírus do mosaico em desenho” .....	30

<b>Figura 9</b>	Sintomas de infecção do isolado viral estudado em cultivares de soja, após 30 dias de inoculação com tampão fosfato. (A) BRS 232; (B) BRS 243 RR; (C) BRS 246 RR; (D) TMG 7262 RR.....	31
<b>Figura 10</b>	Gráfico do resultado do teste de ELISA indireto em cultivares de feijão inoculadas com o isolado viral, utilizando o “antissoro Vírus do mosaico em desenho” .....	33
<b>Figura 11</b>	Sintomas de infecção do isolado estudado em cultivares de feijão, após 30 dias de inoculação com tampão fosfato. (A) BRS 9435 Cometa; (B) BRS MG Pioneiro; (C) BRS Valente; (D) Pérola.....	34
<b>Figura 12</b>	Eletroforese em gel de agarose de RNA extraído a partir do isolado viral purificado, utilizando protocolo descrito por Wellink, 1998, com concentrações virais de 25% (A), 50% (B) e 100% (C) e com o reagente TRIzol® (Life Technologies, EUA), nas concentrações de vírus purificado de 25% (D) e 50% (E).....	35
<b>Figura 13</b>	Eletroforese em gel de agarose do produto de RT-PCR utilizando amostras extraídas de acordo com protocolo descrito por Wellink, 1998, com concentrações virais de 50% (A) e 100% (B). M: Marcador Molecular DNA Molecular Weight Marker X (1 kb ladder) (Roche®, Suíça).....	35
<b>Figura 14</b>	Organização genômica do <i>Bean rugose mosaic virus</i> (BRMV). O genoma consiste de dois RNAs: RNA1 e RNA2. As caixas indicam as regiões codificantes das proteínas preditas: <i>Pro-Co</i> protease cofator, <i>He</i> RNA helicase, <i>caixa preta</i> virus protein genome-linked (VPg), <i>Pro</i> protease, <i>RdRp</i> RNA-dependent RNA polymerase, <i>CR/MP</i> replicase cofator/movement protein, <i>LCP</i> large coat protein, <i>SCP</i> small coat protein, <i>linhas horizontais</i> regiões 5´ e 3´ não traduzidas, <i>AAAAAA<sub>(n)</sub></i> cauda poliA. Massas moleculares calculadas estão listadas acima das regiões de cada proteína; <i>números acima das caixas</i> indicam as posições na sequência de nucleotídeos, enquanto que os <i>números abaixo</i> indicam as posições na sequência de aminoácidos. Os três aminoácidos em cada lado dos sítios de clivagem preditos (em negrito) são mostrados abaixo dos sítios nas poliproteínas, e a posição dos aminoácidos na poliproteína é indicada.....	38

- Figura 15** Árvore filogenética baseada na comparação entre as sequências de aminoácidos da região conservada da protease e polimerase do RNA1 de espécies de *Comovirus*. Valores de bootstrap maiores que 50 estão denotados. Abreviações e números de acesso no GenBank: BBTMV, *Broad bean true mosaic virus*, NC\_022004; BPMV, *Bean pod mottle virus*, NC\_003496; BRMV, *Bean rugose mosaic virus*, KP404602; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NC\_003549; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NC\_003545; RaMV, *Radish mosaic virus*, NC\_010709; RCMV, *Red clover mottle virus*, NC\_003741; SqMV, *Squash mosaic virus*, NC\_003799..... 43
- Figura 16** Árvore filogenética baseada na comparação entre as sequências de aminoácidos da LCP e SCP do RNA2 de espécies de *Comovirus*. Valores de bootstrap maiores que 50 estão denotados. Abreviações e números de acesso no GenBank: APMV, *Andean potato mottle virus*, L16239; BBTMV, *Broad bean true mosaic virus*, NC\_022006; BPMV, *Bean pod mottle virus*, AY744933; BRMV, *Bean rugose mosaic virus*, KP404603; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NC\_003550; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NC\_003544; RaMV, *Radish mosaic virus*, NC\_010710; RCMV, *Red clover mottle virus*, NC\_003738; SqMV, *Squash mosaic virus*, NC\_003800..... 44
- Figura 17** Árvore filogenética baseada na comparação entre as sequências de aminoácidos da poliproteína do RNA1 de espécies de *Comovirus*. Valores de bootstrap maiores que 50 estão denotados. Abreviações e números de acesso no GenBank: BBTMV, *Broad bean true mosaic virus*, NC\_022004; BPMV, *Bean pod mottle virus*, NC\_003496; BRMV, *Bean rugose mosaic virus*, KP404602; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NC\_003549; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NC\_003545; RaMV, *Radish mosaic virus*, NC\_010709; RCMV, *Red clover mottle virus*, NC\_003741; SqMV, *Squash mosaic virus*, NC\_003799..... 45
- Figura 18** Árvore filogenética baseada na comparação entre as sequências de aminoácidos da poliproteína do RNA2 de espécies de *Comovirus*. Valores de bootstrap maiores que 50 estão denotados. Abreviações e números de acesso no GenBank: APMV, *Andean potato mottle virus*, L16239; BBTMV, *Broad bean true mosaic virus*, NC\_022006; BPMV, *Bean pod mottle virus*, AY744933; BRMV, *Bean rugose mosaic virus*, KP404603; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NC\_003550; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NC\_003544; RaMV, *Radish mosaic virus*, NC\_010710; RCMV, *Red clover mottle virus*, NC\_003738; SqMV, *Squash mosaic virus*, NC\_003800..... 46

## LISTA DE ABREVIACOES

aa	–	Aminoácido(s)
APMV	–	Andean potato mottle virus
BBTMV	–	Broad bean true mosaic virus
BCMV	–	Bean common mosaic virus
BDMV	–	Bean dwarf mosaic virus
BGMV	–	Bean golden mosaic virus
BPMV	–	Bean pod mottle virus
BRMV	–	Bean rugose mosaic virus
BYMV	–	Bean yellow mosaic virus
Co-Pro	–	Cofator-Protease
CpMMV	–	Cowpea mild mottle virus
CPMV	–	Cowpea mosaic virus
CPs	–	Proteínas do capsídeo ( <i>Capsid proteins</i> )
CPSMV	–	Cowpea severe mosaic virus
CR	–	Cofator de replicação
ELISA	–	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i>
Hel	–	Helicase
ICTV	–	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
LCP	–	Large capsid protein
MP	–	Proteína de movimento
nt	–	Nucleótido(s)
ORF	–	Fase aberta de leitura ( <i>Open Reading Frame</i> )
pb	–	Pares de bases
Pol	–	polimerase
Pro	–	protease
Pro-Pol	–	Região da protease–polimerase
RaMV	–	Radish mosaic virus
RCMV	–	Red clover mottle virus
RdRp	–	RNA dependent RNA polymerase
SBMV	–	Southern bean mosaic virus
SCP	–	Small capsid protein
SMV	–	Soybean mosaic virus
SqMV	–	Squash mosaic virus
TuRSV	–	Turnip ringspot virus
VIGS	–	Vírus indutores de silenciamento gênico
VPg	–	Proteína viral ligada ao genoma ( <i>Virus protein genome-linked</i> )

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES .....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	4
1. A cultura do feijão e da soja .....	4
2. Gênero <i>Comovirus</i> .....	5
3. Mosaico rugoso do feijoeiro (BRMV) .....	8
4. Outras viroses em feijoeiro.....	10
4.1. Mosaico comum do feijoeiro (BCMV) .....	10
4.2. Mosaico dourado do feijoeiro (BGMV).....	11
4.3. Mosaico angular amarelo do feijoeiro (CpMMV) .....	12
4.4. Mosaico do sul do feijoeiro (SBMV).....	12
4.5. Mosqueado do feijoeiro (BPMV).....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Origem e identificação do isolado viral.....	14
2. Identificação do vírus .....	14
2.1. Teste de dupla-difusão em ágar .....	14
2.2. Teste de ELISA indireto.....	14
2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	15
2.4. Transmissão por vetores ( <i>Diabrotica speciosa</i> ).....	16
2.5. RT-PCR de sequências parciais .....	16
3. Gama de hospedeiras .....	18
4. Pré-purificação do isolado viral.....	18
5. Extração do RNA a partir do vírus purificado.....	19
6. RT-PCR do genoma completo.....	19
7. Sequenciamento de nova geração do genoma viral.....	20
8. Análise de dados e montagem do genoma.....	20
9. Anotação do genoma .....	21
10. Análises filogenéticas .....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
1. Identificação do isolado viral .....	23
1.1. Teste de dupla-difusão em ágar.....	23
1.2. Teste de ELISA indireto.....	24

1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	25
1.4. Transmissão por vetores ( <i>Diabrotica speciosa</i> ).....	26
1.5. RT-PCR de sequências parciais .....	27
2. Gama de hospedeiras .....	28
3. Pré-purificação, extração de RNA e RT-PCR.....	34
4. Sequenciamento, análise de dados, montagem e anotação do genoma.....	36
5. Caracterização genômica.....	37
6. Análises filogenéticas .....	42
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS .....	48

## INTRODUÇÃO

As viroses de plantas constituem um dos principais desafios na produção em larga escala de alimentos. No feijoeiro e na soja, as doenças de etiologia viral são responsáveis por prejuízos consideráveis nestas culturas, tanto pela redução da produtividade e qualidade, quanto pela dificuldade no seu controle (COSTA et al., 1987). Além disso, nestas culturas é comum a ocorrência de infecções mistas, envolvendo diferentes vírus, como o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), gênero *Begomovirus*, e outros vírus, os quais, neste tipo de infecção, acentuam a gravidade das doenças, demonstrando um efeito sinérgico.

Em áreas produtoras de feijão do Estado do Paraná observa-se anualmente a ocorrência do mosaico rugoso do feijoeiro, também conhecido como mosaico em desenho do feijoeiro, causado pelo *Bean rugose mosaic virus* (BRMV), gênero *Comovirus*, ocorrendo juntamente com o BGMV, em infecções mistas, acarretando maior severidade de sintomas e perdas na produção (BIANCHINI et al., 1981). Na soja, pode-se identificar a ocorrência do BRMV, como também a ocorrência do mosaico severo, causado pelo *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), outro comovírus associado a sintomas de queima do broto em plantações de soja (BERTACINI et al., 1994; MARTINS et al., 1994).

A caracterização molecular e a correta classificação dos vírus em gêneros e estirpes genéticas são indispensáveis para garantir soluções e métodos de controle como a resistência de plantas a estes fitovírus (MOREIRA et al., 2010; GONG et al., 2011).

Apenas metade das 16 espécies atualmente conhecidas do gênero *Comovirus* foram totalmente sequenciadas, comparadas, avaliadas filogeneticamente e claramente descritas quantitativamente como espécies distintas (PETRZIK et al., 2005).

A taxonomia dos “picorna-like virus”, incluindo-se a eles os comovírus, tem sofrido uma significativa revisão e diversas alterações ocorreram recentemente, devido ao conhecimento obtido pelo completo sequenciamento genômico de diversas espécies destes vírus. Esta ordem de vírus contém patógenos que infectam vertebrados, insetos, artrópodos, plantas, fungos e algas (SANFAÇON et al., 2009).

Isolados do BRMV do Brasil, encontrados na soja e no feijoeiro, tiveram parte dos seus genomas sequenciados, e até o presente momento estas são as únicas



sequências desse vírus depositadas no GenBank (números de acesso GU205154.1 e AF263548.2), (SOUTO et al., 2002; BARBOZA, 2010).

Os dados do sequenciamento parcial do genoma do BRMV sugerem que este vírus seja distinto do *Bean pod mottle virus* (BPMV), já que a região sequenciada do RNA1 do BRMV (700 pb) apresenta 72% de identidade com a sequência parcial da polimerase do BPMV (BARBOZA, 2010). Para a região sequenciada do RNA 2 (600 pb), a identidade de parte da LCP (*Large coat protein*) do BRMV é menor que 50% com a mesma região do BPMV (SOUTO et al., 2002).

No caso do BPMV a sequência completa do RNA1 possui 5.983 nucleotídeos excluindo a região da cauda poli-A (DI et al., 1999), enquanto a sequência completa do RNA2 apresenta 3.662 pb (MAcFARLANE et al., 1991).

Considerando que as sequências já obtidas para o BRMV são parciais, a correta identificação e o sequenciamento completo do genoma viral do isolado estudado, possivelmente o BRMV, possibilitarão o seu posicionamento taxonômico definitivo dentro do gênero *Comovirus*, segundo os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses).

No caso do BRMV, vírus que infecta a soja e o feijoeiro, com replicação maior na soja do que em feijoeiro (BARBOZA, 2010), o sequenciamento completo do seu genoma, além de contribuir para a sua taxonomia, também oferecerá subsídios para sua utilização em construções de vetores virais indutores de silenciamento gênico (VIGS), com aplicação prática na caracterização funcional de genes de resistência a doenças, como por exemplo, à ferrugem asiática da soja (GARCIA et al., 2011).

O processo conhecido como silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS – Virus-induced gene silencing), tem sido utilizado como ferramenta para estudos de genética reversa, testes de genes, e também na determinação da importância dos genes da hospedeira na resistência a doenças (ZHANG et al., 2010). Alguns vírus de RNA já foram utilizados nas construções de VIGS em soja, como o *Tobacco rattle virus*, gênero *Tobravirus* (JEONG et al., 2005), o *Cucumber mosaic virus*, gênero *Cucumovirus* (NAGAMATSU et al., 2007) e o BPMV (ZHANG et al., 2010; COOPER et al., 2013).

Embora a ocorrência do BPMV já tenha sido relatada, este não é um vírus endêmico no Brasil, o que dificulta a sua utilização em trabalhos de silenciamento gênico. Já o BRMV é um vírus endêmico no país, estando parcialmente disseminado nas áreas de plantio de soja e feijoeiro do Paraná, o que o torna um bom candidato para

ser utilizado como vetor de expressão de genes exógenos visando o desencadeamento de silenciamento gênico.

O objetivo deste trabalho foi de identificar um isolado viral, além de sequenciar completamente seu genoma, bem como fazer uma montagem, análise e anotação deste genoma, para correta taxonomia e classificação deste vírus dentro do gênero *Comovirus*.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. A cultura do feijão e da soja

A família *Fabaceae*, também conhecida como *Leguminosae*, é uma grande e economicamente importante família botânica, devido à sua diversidade, abundância e importância na agricultura, dentre as quais, destacam-se a produção de grãos como feijão e soja (DUKE, 1992; GRAHAM & VANCE, 2003).

O feijão comum é uma importante fonte de proteína na dieta humana brasileira, além de possuir um elevado conteúdo calórico. A maioria das cultivares brasileiras de feijão possuem um valor aproximado de 20 a 25% de proteínas, sendo ricas em lisina, um dos aminoácidos essenciais (VIEIRA et al., 1998).

A área plantada de feijão no Brasil, durante as três safras anuais entre 2013 e 2014, foi de 3.333.400 ha, com uma produção de 3.441.100 toneladas. Para as safras 2014/2015 a previsão é de uma área plantada de 3.233.100 ha, com produção estimada em 3.202.600 toneladas (CONAB, 2014). De acordo com Bianchini et al. (1997), no Brasil já foram descritas mais de 10 viroses em feijoeiro.

A cultura da soja, durante a safra de 2013/2014, teve uma área plantada de 30.173.100 ha no país, produzindo um total de 86.120.800 toneladas. Por outro lado, para a safra de 2014/2015, estima-se que a produção atinja 91.744.500 toneladas, em 31.698.100 ha plantados (CONAB, 2014). De acordo com Almeida et al (2005), já foram identificadas, aproximadamente, 40 doenças na cultura da soja no Brasil, sendo pelo menos seis causadas por vírus.

As principais doenças que diminuem a produtividade no feijoeiro são ocasionadas por fungos. Em seguida, as viroses causam danos de expressiva importância econômica. As principais viroses desta cultura são o mosaico-comum, causado pelo *Bean common mosaic virus* (BCMV), gênero *Potyvirus* e o mosaico-dourado, causado pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), gênero *Begomovirus* (YOKOYAMA, 2000). Outros vírus que infectam o feijoeiro são os potyvírus *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) e o *Soybean mosaic virus* (SMV), o begomovírus *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) e o comovírus *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) (HALL, 1991).

O número de doenças causadas por vírus em feijoeiro na América Latina ainda é desconhecido, devido principalmente à incompleta caracterização desses patógenos e

suas estirpes e às variações na sintomatologia induzida por um mesmo agente em diferentes regiões, o que ocasiona confusões (MUÑOZ & KITAJIMA, 1990). Portanto, é de extrema importância para o desenvolvimento de cultivares resistentes a identificação e o conhecimento dos isolados existentes numa determinada região, pois diferentes genes de resistência podem controlar a virulência de diferentes estirpes (BOARI & FIGUEIRA, 1996). As evoluções destas doenças a campo podem também alterar-se pela presença de vários vírus quando infectam simultaneamente a planta (co-infecção), dando como resultado sintomas diferentes e mais complexos (SCHOONHOVEN & PASTOR-CORRALES, 1987).

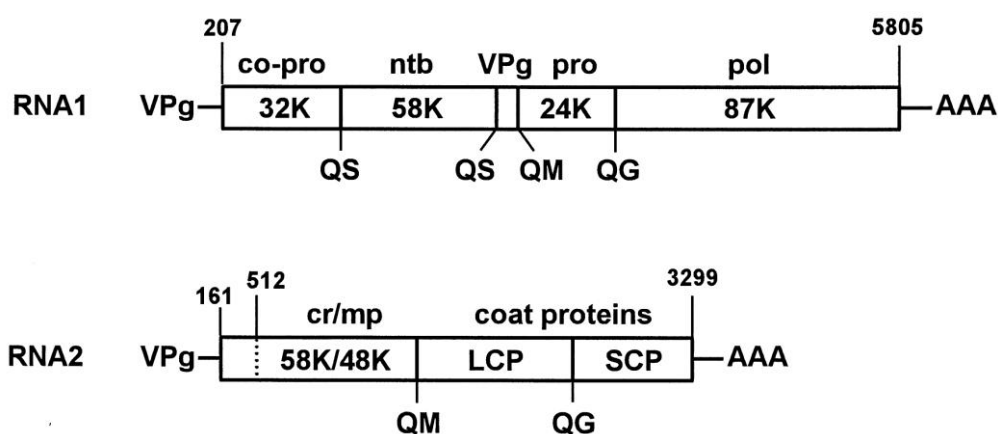
Segundo Vance et al. (1995), a co-infecção por mais de um vírus é comum em plantas superiores, inclusive na soja. Estes vírus são capazes de se replicar em uma mesma célula, interagindo de forma antagônica ou sinérgica. Essa interação sinérgica geralmente resulta em sintomas mais severos do que quando um único vírus ataca a planta ou pode provocar alterações na concentração de um ou dos demais vírus do complexo (POOLPOL & INOUYE, 1986).

## 2. Gênero *Comovirus*

A família *Comoviridae* é composta por três gêneros: *Comovirus*, *Nepovirus* e *Fabavirus*, sendo estes gêneros divididos de acordo com o tipo de inseto vetor e relação sorológica. O genoma dos comovírus é composto por duas moléculas de RNA de fita simples, senso positivo (RNA1 e RNA2). Estes RNAs são encapsulados separadamente em partículas icosaédricas não envelopadas, com diâmetro entre 28 e 30 nm (WELLINK, 1998). O RNA1 possui aproximadamente 5.900 nucleotídeos, ao passo que o RNA2, tem um tamanho aproximado de 3.500 nucleotídeos. Ambos possuem uma proteína viral (VPg) ligada covalentemente à extremidade 5' e uma cauda poli-A ligada à extremidade 3' (GOLDBACH & WELLINK, 1996).

A gama de hospedeiras dos comovírus é estreita, sendo que 11, das 15 espécies do gênero infectam espécies de plantas da família *Fabaceae* (*Leguminosae*). O *Andean potato mottle virus* (APMV), o *Radish mosaic virus* (RaMV), o *Squash mosaic virus* (SqMV) e o *Ullucus virus C* (UVC) infectam plantas não-leguminosas (LE GALL et al., 2005). A transmissão por vetores dos comovírus ocorre de maneira semi-persistente ou não-persistente por besouros crisomelídeos e também podem ser facilmente transmitidos por inoculação mecânica experimental (DAUBERT et al., 1978).

Estudos com o *Cowpea mosaic virus* (CPMV), a espécie tipo do gênero *Comovirus*, demonstraram que cada RNA possui uma única fase aberta de leitura (*open reading frame* – ORF). A ORF do RNA1 codifica proteínas que estão envolvidas na replicação, e a ORF do RNA2 codifica proteínas estruturais e proteínas necessárias para o movimento célula-a-célula. As proteínas virais funcionais são produzidas por clivagens de ambas poliproteínas originárias da replicação dos RNAs por proteases codificadas pelo vírus, as quais realizam clivagens em regiões conservadas do genoma viral (POUWELS et al., 2002). Conforme apresentado por Carette et al. (2002), a Figura 1 representa a organização genômica das duas moléculas de RNA do CPMV.



**Figura 1** Organização genômica do CPMV. ORFs nas moléculas de RNA são indicadas por barras abertas. As posições dos nucleotídeos nos códons de início e de parada são mostrados acima das ORFs, e os sítios de clivagem nas poliproteínas são mostrados abaixo. Abreviações: co-pro, cofator protease; ntb, proteína de ligação de nucleotídeo; pro, protease; pol, polimerase; cr, cofator de replicação RNA2; mp, proteína de movimento; LCP, proteína da capa maior; SCP, proteína da capa menor (CARETTE, et al., 2002).

De acordo com Goldbach & Wellink (1996), o RNA1 do CPMV contém 5.889 nucleotídeos e o RNA2 é formado por 3.481 nucleotídeos. As duas moléculas contêm a proteína VPg na extremidade 5' e cauda poliadenilada na extremidade 3'. Segundo os mesmos autores, este vírus possui quantidades similares dos dois polipeptídeos com massas moleculares de 23 e 37 kDa, proteínas S (*Small*) e L (*Large*), que constituem a capa protéica das partículas.

Segundo Matthews (1992), o RNA1 ou RNA B (*bottom component*), codifica proteínas para a replicação viral e processos proteolíticos, além de codificar a proteína viral ligada à extremidade 5' de ambos RNAs (*virus protein genome-linked* – VPg). Por outro lado, o RNA2 ou RNA M (*middle component*), codifica proteínas necessárias à movimentação do vírus célula-a-célula e à movimentos a longas distâncias (proteínas MP). O RNA2 também codifica proteínas que participam da formação do capsídeo. Os dois RNAs são necessários para que ocorra a infecção sistêmica das plantas hospedeiras.

A sequência de senso positivo do RNA1 é capaz de codificar um polipeptídeo de 208 K (LOMONOSSOFF & SHANKS, 1983). Esta única ORF se inicia com o códon AUG na posição 207, e termina com o códon UAG na posição 5.805. Esta região terminadora é seguida de 82 nucleotídeos antes da cauda poli-A (LOMONOSSOFF et al., 1982).

O RNA2 apresenta a síntese de dois polipeptídeos sobrepostos no mesmo quadro de leitura (de 95 K e 105 K), diferindo-se entre si na região *N*-terminal, que começam com o códon da metionina nas posições 512 e 524, respectivamente (PELHAM, 1979; GOLDBACH et al., 1981). A sequência deste RNA sugere que o primeiro códon AUG não é funcional devido ao contexto de nucleotídeos não apropriados em que está circundado. A região 3' não traduzida contém 180 nucleotídeos (WEZENBEEK et al., 1983).

O critério de demarcação de espécies para o gênero *Comovirus*, de acordo com o 9<sup>th</sup> *Report of the ICTV*, se baseia no pressuposto de que espécies diferentes apresentam as seguintes características: a) sequência de aminoácidos das capas proteicas (CPs) com menos de 75% de identidade; b) sequência de aminoácidos da região conservada da Proteínase-Polimerase (Pro-Pol), com menos de 80% de identidade; c) diferenças nas reações antigênicas (sorológicas); d) gama de hospedeiras distintas; e) especificidade do vetor distinta; f) ausência de proteção cruzada; g) ausência de re-ordenação entre RNA1 e RNA2 (SANFAÇON et al., 2011). De acordo com os mesmos critérios estabelecidos, nem todas as características devem estar simultaneamente presentes, porém, as duas regiões genômicas (RNA1 e 2) devem ser analisadas. Nos casos onde as porcentagens de identidade das sequências estiverem próximas do limite de corte proposto, então os outros critérios devem ser considerados.

Segundo Le Gall et al. (2005), no gênero *Comovirus* a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e a LCP são as proteínas mais conservadas codificadas

pelo RNA1 e RNA2, respectivamente, exceto a VPg. A identidade na sequência de aminoácidos destas proteínas tem sido usada como critério de demarcação de espécie.

A região genômica correspondente a RNA polimerase (RdRp) é de fundamental importância para a replicação viral. Acredita-se que esta região não sofra grandes modificações na sua sequência, apresentando-se muito conservada no genoma das diferentes espécies de um mesmo gênero de vírus (KOONIN & DOLJA, 1993).

Koonin (1991), alinhando 46 sequências de 30 grupos de vírus, observou 380 posições semelhantes entre os vírus estudados, o que inclui oito *motifs* (resíduos conservados entre sequências alinhadas) distintos de aminoácidos nas sequências correspondentes à RdRp dos vírus de RNA senso positivo analisados. Os *motifs* IV a VII foram descritos anteriormente por Koonin et al. (1989). O *motif* VI que apresenta a tríade de aminoácidos GDD (glicina, aspartato, aspartato) é o mais conservado e presume-se que o mesmo esteja envolvido com a atividade catalítica da RNA polimerase (WANG et al., 2007), sendo portanto de extrema importância também para identificação de membros da família Comoviridae (KAMER & ARGOS, 1984).

### **3. Mosaico rugoso do feijoeiro (BRMV)**

O Vírus do mosaico rugoso do feijoeiro (*Bean rugose mosaic virus* – BRMV), também conhecido como Vírus do mosaico em desenho do feijoeiro, pertence ao gênero *Comovirus*, família *Comoviridae*, descrito pela primeira vez infectando feijão na Costa Rica (GÁMEZ, 1972 e 1982). Em seguida, a doença foi descrita na Guatemala (CARTÍN, 1973), El Salvador (GÁLVEZ et al., 1977), Brasil (LIN et al., 1981), Colômbia (ACOSTA et al., 1986), Honduras e Nicarágua (GÁMEZ, 1977). No Brasil, o primeiro relato ocorreu em São Paulo (CAMARGO et al., 1969), seguido pelo Distrito Federal (KITAJIMA et al., 1980), Paraná (BIANCHINI et al., 1985), Minas Gerais e Goiás (ANJOS et al., 1986; LIN et al., 1981).

O *Bean rugose mosaic virus* está presente nas regiões produtoras de feijão no Estado do Paraná, principalmente em infecções mistas com o *Bean golden mosaic virus*, o que proporciona maior severidade de sintomas causando perdas na produção (BIANCHINI et al., 1985; MARTINS et al., 1994). Outro caso de infecção mista muito comum, ocorre com espécies de *Potyvirus*, como o *Bean common mosaic virus* (GASPARIN et al., 2005).

A infecção em feijão por BRMV induz sintomas de mosaico intenso, rugosidade, deformação das folhas e vagens, em casos mais graves provoca a formação

de bolhas nas folhas, nanismo da planta e faixas verdes escuras nas nervuras. Este vírus possui uma restrita gama de hospedeiras, infectando espécies pertencentes à família *Fabaceae*, como *Phaseolus vulgaris*, *Glicine max* e *Vicia faba*, infectando também *Chenopodium amaranticolor* (família *Chenopodiaceae*) (GAMEZ, 1972; GAMEZ 1982).

O BRMV, sob condições experimentais, causou perdas na produção de feijão entre 11,2 e 72%, conforme a cultivar (BIANCHINI et al., 1997). Este vírus está disseminado em todo o Estado do Paraná, onde já foram encontradas lavouras com mais de 50% das plantas com sintomas. Neste Estado, ocorre uma maior frequência do vírus na safra da seca, possivelmente devido à maior infestação de insetos crisomelídeos, vetores deste vírus. Nesta safra, a ocorrência do BRMV é ainda mais severa devido à infecções mistas com o BGMV, podendo causar a total perda da capacidade produtiva da cultura (BIANCHINI et al., 2000).

A ocorrência de BRMV em feijoeiro, sob condições favoráveis, pode ocasionar perdas consideráveis, reduzindo o rendimento da produção em diversas variedades, como no caso das variedades Jalo e Carioca, que apresentam perdas no rendimento de 29 a 59% e 20 a 56%, respectivamente (SPERANDIO, 1982), sendo que o número de vagens por planta também pode ser afetado (COSTA, 1983). O BRMV infecta sistematicamente a maioria das cultivares de feijão recomendadas para plantio no Brasil, com sintomas variáveis. O sintoma de mosaico predomina na maioria das cultivares, com formação de um desenho típico no limbo foliar. Outros sintomas incluem formação de bolhas, deformação foliar e lesões locais cloróticas, observados nas cultivares Goiano Precoce, Manteiga, Mulatinho Paulista, Aeté, Aysó, Carioca 80, Costa Rica, Catú e Jalo. Lesões locais necróticas e necrose de nervuras ocorrem nas cultivares Venezuela 36, IPA 5047, Carioca e Rio Tibagi (COSTA, 1983; ANJOS et al., 1994).

As maiores perdas no rendimento da cultura do feijoeiro ocorrem quando as infecções são precoces, ou seja, até 14 dias após o plantio, e sob condições de infecções mistas com outros vírus (COSTA, 1983; ANJOS et al., 1994; BIANCHINI & BERGAMIN FILHO, 1994; MARTINS et al., 1994). Considerando-se as características de seus insetos vetores, que são polípagos e ocorrem em todo o país e em todas as épocas do ano, vírus como o BRMV poderão se tornar um problema sério em soja e feijoeiro, devido ao cultivo sucessivo, proximidade dessas culturas e severidade das infecções mistas (SOUTO et al., 2002).



Assim como em plantas de feijão, a soja também pode ser infectada pelo BRMV. As plantas infectadas apresentam sintomas de mosaico severo, com leve encarquilhamento das folhas, podendo desenvolver bolhas verde-escuras circundadas por áreas verde-claras, levemente translúcidas (ALMEIDA et al., 1997). A ocorrência desta virose em soja pode gerar grandes perdas, dependendo da cultivar, principalmente quando em infecções mistas com outros vírus, como o mosaico comum da soja, podendo ocorrer sinergismo e acarretar perdas de até 26% na produtividade (ALMEIDA et al., 1997; ALMEIDA, 2000).

A transmissão natural do BRMV ocorre por vetores, besouros Coleópteros da ordem *Chrysomelidae*. Os insetos vetores mais comuns são *Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa*, tendo a espécie *C. arcuata* a transmissão mais eficiente (FULTON & SCOOTT, 1977; COSTA et al., 1981; MARTINS et al., 1994). Este vírus não apresenta transmissão via semente, tanto em feijão como em soja, mas é facilmente transmitido mecanicamente via extrato vegetal tamponado (GAMEZ, 1972; GALVEZ et al., 1977; SPERANDIO, 1982; MARTINS et al., 1994).

Estudos de microscopia eletrônica em tecidos foliares de feijoeiro infectados com BRMV demonstraram alta concentração viral, além de inclusões citoplasmáticas cristalinas nas células (CAMARGO et al., 1969, 1976; MUÑOZ & KITAJIMA, 1990). Através da microscopia óptica, é possível observar cristais densos de perfil poligonal, formados por vírions no citoplasma de células epidérmicas dos parênquimas, de tricomas e em células-guarda dos estômatos (MUÑOZ & KITAJIMA, 1990). A presença desses cristais é de grande importância para a identificação do BRMV e sua distinção dentre os diversos vírus que também causam sintomas de mosaico em feijoeiro (EDWARSON & CHRISTIE, 1978; MUÑOZ & KITAJIMA, 1990).

#### **4. Outras viroses em feijoeiro**

##### **4.1. Mosaico comum do feijoeiro (BCMV)**

O mosaico comum do feijoeiro é causado pelo *Bean common mosaic virus* (BCMV), pertencente à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, podendo causar perdas de 35 a 98% na produção, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta na época da infecção (FARIA et al., 1996). Seus sintomas são mosaico foliar acompanhando as nervuras, e em casos mais severos, ocorre formação de bolhas nas áreas verdes escuras, enrolamento e diminuição de tamanho dos folíolos. Existe também

uma necrose sistêmica, se caracterizando por uma necrose vascular, evoluindo do ápice para a base da planta, descoloração do caule e necrose das nervuras nos folíolos, seguida da morte apical e morte da planta (BIANCHINI et al., 2005). O mesmo autor relata que a transmissão ocorre por sementes, mecanicamente de planta a planta e por pulgões, sendo este o principal vetor, com forma de transmissão não persistente. Através da utilização de cultivares resistentes, o impacto econômico causado pelo BCMV teve um decréscimo nas últimas décadas (COSTA, 1987).

#### **4.2. Mosaico dourado do feijoeiro (BGMV)**

O mosaico dourado do feijoeiro é a virose mais importante da cultura do feijão no Brasil e é causado pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus* (GASPARIN et al., 2005). Segundo o mesmo autor, no estado do Paraná ocorrem infecções simples deste vírus, ou infecções mistas, tanto com espécies de outros geminivírus, como com vírus isométricos, destacando-se o *Bean rugose mosaic virus*. Desta forma, a doença caracterizada como “mosaico dourado”, pode ser causada por um complexo virótico por meio desta infecção mista, constituindo um grupo bastante heterogêneo, englobando representantes dos gêneros *Comovirus*, *Cucumovirus* e *Sobemovirus* (COSTA, 1987). Existem relatos da ocorrência do BGMV juntamente com o *Bean common mosaic virus* em feijão, também com o Vírus do mosaico severo do caupi – estirpe feijão (*Cowpea severe mosaic virus* – CPSMV), gênero *Comovirus*, ou ainda com o Vírus do mosaico do sul do feijoeiro (*Southern bean mosaic virus* – SBMV), gênero *Sobemovirus* (COSTA, 1987). Os danos provocados nestes casos são mais severos do que aqueles causados por infecções individuais por qualquer um dos vírus, ocorrendo também quebra de resistência ao BGMV em variedades resistentes quando em infecção mista (BIANCHINI et al., 1997).

Em consequência da redução do peso e da qualidade dos grãos (BIANCHINI et al., 1989), as perdas podem variar de 30 a 100%, dependendo da cultivar, estágio da planta, infestação de insetos vetores, presença de espécies hospedeiras alternativas e condições ambientais (FARIA et al., 1996). A gama de hospedeiras do BGMV é bastante restrita, sendo quase que exclusivamente leguminosas, inclusive as de maior interesse econômico, como o feijoeiro comum e a soja (MOREIRA & GASPAR, 2002). Os sintomas mais comuns são o mosaico amarelo intenso em todo o limbo foliar, podendo ocorrer nanismo, encurtamento de entre-nós, perda de dominância apical e

brotamento das gemas axilares (FURLAN, 2004). Os sintomas desencadeados pela mosca branca (*Bemisia tabaci*), que é um vetor deste *Begomovirus* incluem intensa clorose foliar, deformação das vagens e atrofiamento das plantas (GALVEZ & MORALES, 1994).

#### **4.3. Mosaico angular amarelo do feijoeiro (CpMMV)**

O mosaico angular amarelo é causado pelo *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV) pertencente ao gênero *Carlavirus* (GASPAR & COSTA, 1993). Os sintomas induzidos são de necrose da haste, causando seca e morte em plantas de soja (ALMEIDA et al., 2002), ocorrendo também mosaico e necrose nas folhas das plantas de feijão além de murchamento nas plantas (HALL, 1991). Acredita-se que existem diversas estirpes do CpMMV, sendo que a mais severa delas possa causar reduções de produtividade sempre superiores a 85%, em variedades suscetíveis (ALMEIDA et al., 2003), chegando a 100% (HOFFMANN et al., 2003). A mosca branca (*Bemisia tabaci*) é o principal vetor do CpMMV, sendo também facilmente transmitido por inoculação mecânica (COSTA et al., 1980).

#### **4.4. Mosaico do sul do feijoeiro (SBMV)**

O mosaico do sul do feijoeiro, cujo agente etiológico é o *Southern bean mosaic virus* (SBMV), pertencente ao gênero *Sobemovirus*, ocasiona sintomas de mosaico fraco a severo, deformação da vagem e distorção foliar (CUPERTINO et al., 1982), podendo causar manchas necróticas circulares nas folhas, deformação e redução nas sementes, embora a redução nas sementes tenha pouca ocorrência. Os principais vetores são os afídeos (HALL, 1991).

#### **4.5. Mosqueado do feijoeiro (BPMV)**

O Vírus do mosqueado do feijoeiro (*Bean pod mottle virus* – BPMV) teve sua ocorrência descrita em campos experimentais da Embrapa-Cerrados, Planaltina e Distrito Federal, ocorrendo em soja Itiquira, nos anos de 1992 e 1993. Este vírus pertence ao gênero *Comovirus*, família *Comoviridae*, tendo os besouros da família *Chrysomelidae* como principais vetores. As plantas de soja quando infectadas apresentam sintomas de mosqueado verde-amarelo nas folhas e, em algumas cultivares, exibe aspecto de formação de bolhas e redução do porte (ANJOS et al., 2000). Infecções

pelo BPMV também foram descritas em regiões de soja do sul e leste dos Estados Unidos e em áreas endêmicas com alta população de insetos vetores, ocasionando a redução de até 40% do rendimento (GHABRIAL et al., 1990).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Origem e identificação do isolado viral

O isolado utilizado neste trabalho, suspeitando-se ser o *Bean rugose mosaic virus*, foi coletado em plantas de feijão e cedido pelo pesquisador Álvaro Manuel Rodrigues Almeida, da Embrapa Soja, em Londrina, PR. O isolado viral foi mantido em plantas de feijão cultivar Rio Tibagi, inoculadas com tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0, utilizando carvão vegetal finamente moído como abrasivo, em casa de vegetação. Este isolado também foi mantido por meio de folhas com sintomas em solução de glicerol e tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0, na proporção de 1:1, à temperatura de -20 °C, no laboratório de virologia vegetal da UEM. A temperatura da casa de vegetação durante a condução dos experimentos variou de 18 °C a 38 °C.

### 2. Identificação do vírus

A identificação do vírus baseou-se em diferentes métodos biológicos, sorológicos e moleculares, descritos a seguir.

#### 2.1. Teste de dupla-difusão em ágar

Nos testes de dupla-difusão em ágar foram utilizadas folhas de feijão cultivar Rio Tibagi, inoculadas e com sintomas do isolado em estudo, e também folhas de plantas de feijão da mesma cultivar sadias, como controle negativo, inoculadas apenas com tampão fosfato. As amostras foram maceradas em água destilada, na proporção de 1 g de tecido vegetal para 1 mL de água, e em seguida filtradas em gaze dupla. Foram testados cinco antissoros produzidos contra o BRMV pertencentes ao banco de antissoros do laboratório de virologia da Embrapa Soja.

#### 2.2. Teste de ELISA indireto

Os testes de ELISA indireto foram realizados com dois dos antissoros utilizados no teste de dupla-difusão em ágar (identificados como “antissoro Vírus do mosaico em desenho”, e “antissoro Vírus do mosaico rugoso”), e também com o antissoro contra *Potyvirus* produzido pela Agdia®, EUA. Os testes foram realizados no laboratório de virologia vegetal da UEM. As amostras de plantas infectadas e as de plantas sadias foram maceradas em tampão cobertura ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,59 g;  $\text{NaHCO}_3$  2,93 g;

NaN<sub>3</sub> 0,2 g; H<sub>2</sub>O q.s.p. 1.000 mL, pH 9,6), na proporção de 0,1 g de tecido foliar para 1,0 mL de tampão. Também foram utilizadas plantas de melancia infectadas com *Potyvirus* como controle positivo nos testes com o antissoro para potyvírus. Foram aplicados 100 µL de cada amostra em cada orifício da placa de 96 poços, com três repetições por amostra. Nos três orifícios brancos, foi aplicada apenas a mesma quantidade de tampão cobertura. As placas foram incubadas a 4 °C por 16 horas em câmara úmida. Em seguida, foram esvaziadas e lavadas três vezes, com intervalo de três minutos entre cada lavagem, com tampão PBS-Tween (NaCl 8 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g; NaHPO<sub>4</sub> 1,1 g; KCl 0,2 g, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1.000 mL, pH 7,4; 500 µL Tween 20). Aos orifícios, foram adicionados 100 µL dos antissoros, nas concentrações de 1:100 para os antissoros contra *Comovirus* e 1:100 para o antissoro contra *Potyvirus*.

Os antissoros foram diluídos em tampão PBS (NaCl 8 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g; NaHPO<sub>4</sub> 1,1 g; KCl 0,2 g, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1.000 mL, pH 7,4). No “branco”, foi aplicado apenas o mesmo volume de tampão PBS. As placas foram incubadas a 37 °C por duas horas em câmara úmida, e em seguida lavadas conforme descrito anteriormente. Foram aplicados em cada poço 100 µL da solução anti-IgG obtida da cabra, conjugada à enzima fosfatase alcalina (Anti rabbit IgG – Alkaline Phosphatase antibody, Sigma-Aldrich®, EUA), diluída para 1:10.000 em tampão PBS. No branco, foi aplicado apenas PBS. Novamente as placas foram incubadas a 37 °C por duas horas em câmara úmida e, em seguida, esvaziadas e lavadas. Ao final, foi aplicado 100 µL de substrato em cada orifício da placa, [10 mg da enzima p-nitrofenilfosfato, diluídos em 10 mL de tampão substrato (Dietanolamina 97 mL; NaN<sub>3</sub> 0,2 g; H<sub>2</sub>O q.s.p. 1.000 mL; pH 9.8)]. Após uma hora, as placas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 405 nm, no equipamento VersaMax (Molecular Devices, EUA), e os dados analisados utilizando o software SoftMax® Pro S (Molecular Devices, EUA).

### **2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Exames de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados em folhas de feijão da cultivar Rio Tibagi, com sintomas do vírus, por meio de cortes ultrafinos, contrastados em acetato de uranila 1% e citrato de chumbo. As amostras foram enviadas para o NAP/MEPA – Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP, e foram analisadas sob microscópio eletrônico de transmissão pelo Prof. Dr. E. W. Kitajima.

#### **2.4. Transmissão por vetores (*Diabrotica speciosa*)**

Os insetos utilizados para o teste (*Diabrotica speciosa*), foram coletados a campo, deixados em campânulas em plantas de feijão ‘Rio Tibagi’ sadias, para a desinfecção de possíveis vírus pré-existentes nos insetos. Estes foram trocados sucessivamente de plantas a cada cinco dias, por um período de vinte dias. Após esta desinfecção, os insetos avirulíferos foram submetidos ao período de aquisição, em plantas de feijão ‘Rio Tibagi’ inoculadas e com sintomas do vírus por 48 horas. Em seguida, os insetos foram transferidos para plantas sadias de feijão ‘Rio Tibagi’, por um período de 48 horas (período de inoculação), numa quantidade de três insetos por planta, em cinco vasos contendo três plantas cada vaso. As plantas foram mantidas em casas de vegetação da TMG – Tropical Melhoramento & Genética, Londrina, PR, para a verificação da transmissão viral por aparecimento de sintomas visuais. Os resultados também foram confirmados utilizando o teste de ELISA indireto, seguindo protocolo descrito no item 2.2.

#### **2.5. RT-PCR de sequências parciais**

Na detecção molecular, conduzida no laboratório de virologia vegetal da UEM, os testes por reações de RT-PCR utilizaram *primers* desenhados a partir das sequências de nucleotídeos parciais já conhecidas do BRMV depositadas no GenBank (números de acesso: RNA1 – GU205154.2 e RNA2 – AF263548.2). Foram desenhados dois pares de *primers*, um objetivando amplificar parte da região codificadora da RdRp no RNA1 e outro para amplificar parte da sequência codificadora das CPs do RNA2, utilizando o programa Primer-BLAST do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), além de *primers* degenerados desenhados pelo pesquisador Dr. Ricardo Harakava (Tabela 1). Estes últimos, com objetivo de amplificar um fragmento do RNA1 dos comovírus, baseando-se no alinhamento das sequências de diferentes vírus deste gênero, correspondentes às regiões conservadas codificadoras dos aminoácidos ATSEGFPH (*primer* F, nt 4205-4227 do genoma do *Bean pod mottle virus* acesso GenBank NC003496) e ECGIPSGF (*primer* R, nt 4793-4815) da replicase codificada pelo RNA1.

O RNA total de plantas infectadas de feijão cultivar Rio Tibagi com o vírus em estudo foi extraído com o reagente TRIzol® (Life Technologies, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O cDNA foi obtido por reação de transcrição reversa utilizando o kit M-MLV Reverse Transcriptase (Life Technologies, EUA), seguindo as recomendações técnicas sugeridas pelo fabricante.

As reações de PCR, com volume final de 25 µL, continham 250 ng de cDNA; 1X PCR Buffer; 0,8 mM de dNTP mix (10 mM cada); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0,2 µM de *primer Forward* (10 µM); 0,2 µM de *primer Reverse* (10 µM); 2 U Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Life Technologies, EUA). As reações de PCR seguiram os seguintes ciclos: Desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e por fim, extensão final a 72 °C por 10 min.

Todas as reações de RT-PCR foram realizadas com RNAs obtidos de plantas inoculadas e com sintomas do isolado estudado, e também com plantas saudáveis, como controle negativo. Reações contendo apenas água, no lugar das amostras foram utilizadas como “branco”.

As amplificações do produto de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizadas em luz ultravioleta.

**Tabela 1** *Primers* utilizados nas reações de PCR, para identificação do isolado viral em estudo

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho do amplicon</i>
BRMV RNA1 F	5'-CTGTGTGGCGGTGGACCGAA-3'	210 pb
BRMV RNA1 R	5'-TGGTGCCTTACTCGAGCGCA-3'	
BRMV RNA2 F	5'-TCCCTTGGCAAACCTGCTGCG-3'	180 pb
BRMV RNA2 R	5'-TGTGGATCACCCATACGCCAGGT-3'	
Comovirus RNA1 F	5'-GCNACNTCNGARGGNTTYCCNCA-3'	611 pb
Comovirus RNA1 R	5'-AANCCNGANGGDATNCCRCAYTC-3'	

Os produtos de PCR foram precipitados e purificados com a adição de acetato de sódio 3 M pH 5,2 na proporção de 10% do volume final, e etanol 100% na proporção de duas vezes do volume final do produto de PCR obtido. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a -20 °C por uma noite. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000g por 30 minutos a 4 °C. Os precipitados foram lavados com etanol 70%, secos em temperatura ambiente e ressuspendidos em água ultra-pura.

Os produtos de PCR foram encaminhados para sequenciamento ao Setor de Sequenciamento de DNA, no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, em São Paulo, SP. O sequenciamento foi feito com o sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems®, EUA), de 48 capilares. As reações de sequenciamento utilizaram o BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, EUA). As corridas foram realizadas em capilares de 36 cm com o polímero POP7. As



sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB. Os resultados foram comparados com sequências de outros *Comovirus* disponíveis no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)), por meio do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### **3. Gama de hospedeiras**

O teste de gama de hospedeiras foi realizado com 17 cultivares de feijão e 29 cultivares de soja (Tabela 2). As plantas foram inoculadas 15 dias após a germinação, utilizando-se folhas de feijão da cultivar Rio Tibagi com sintomas do vírus, que foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 e carvão vegetal finamente moído como abrasivo. As cultivares inoculadas foram mantidas em casa de vegetação para o desenvolvimento e observação dos sintomas. Após 30 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas quanto ao aparecimento de sintomas, e estes resultados foram confirmados utilizando o teste de ELISA Indireto, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, e também por meio de reações de PCR utilizando os *primers* descritos na Tabela 1 e a metodologia já descrita.

### **4. Pré-purificação do isolado viral**

A pré-purificação do vírus foi realizada no setor de virologia da Embrapa Soja, de acordo com protocolo descrito por Wellink (1998), com algumas modificações. Cem gramas de folhas de feijão da cultivar Rio Tibagi inoculadas e com sintomas do isolado viral foram trituradas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, na proporção de 2 mL de tampão para cada grama de tecido foliar. Durante a trituração, foi adicionado 1% de sulfito de sódio e 0,01 M de EDTA. O triturado foi filtrado com auxílio de uma gaze dupla e mantido sob baixa temperatura (banho de gelo). Em seguida, foram adicionados 25% do volume de clorofórmio e 25% do volume de butanol, sob agitação por 10 minutos a 4 °C. A solução foi centrifugada a 15.000g por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, foi recolhido o sobrenadante com o auxílio de uma bomba de vácuo e, então, foi adicionado 8% do volume recuperado de PEG 8.000. Esta mistura foi mantida sob agitação em câmara fria por uma hora e meia. Procedeu-se uma centrifugação a 20.000g por 30 minutos a 4 °C, e o precipitado foi resuspenso em 32 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, sob agitação por uma noite a 10 °C. Uma baixa centrifugação foi feita a 10.000g por 15 minutos, descartando-se o precipitado e o sobrenadante foi centrifugado em um colchão de sacarose a 20% em alta centrifugação a 150.000g por 3

horas a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 600 µL de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, sob agitação por uma noite a baixa temperatura. Uma baixa centrifugação a 10.000g por 10 minutos a 4 °C foi feita, onde o sobrenadante contendo o vírus purificado foi coletado.

## **5. Extração do RNA a partir do vírus purificado**

Dois métodos foram testados para a extração do RNA do vírus purificado. No primeiro, foi seguido o protocolo de extração com o reagente TRIzol® (Life Technologies, EUA), utilizando o vírus purificado nas concentrações de 25% e 50%. No segundo método testado, proposto por Wellink (1998), foi utilizado 100 µL do vírus purificado nas concentrações de 25%, 50% e 100%. Neste último método, a cada amostra, foram adicionados os mesmos volumes de tampão de extração (0,02 M Tris-HCl, pH 7,6; 0,2 M NaCl; 2 mM EDTA; 4% SDS) e duas vezes o volume de fenol (equilibrado para pH 8,0, contendo 0,1% de hidroxiquinolina). Em seguida as amostras foram agitadas em vortex por três minutos. Após a agitação, foram adicionadas duas vezes o volume de clorofórmio e agitou-se por dois minutos, seguido de centrifugação a 10.000g por dois minutos. A fase superior foi coletada e sobre esta, foi acrescentado acetato de sódio 3 M, pH 5,2, na proporção de 10% do volume final, e etanol 100% na proporção de duas vezes do volume final do produto de PCR obtido. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a -20 °C por uma noite. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 6.000g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados foram lavados com etanol 70% e novamente centrifugados a 6.000g por 5 minutos a 4 °C. Os precipitados foram secos em temperatura ambiente e depois resuspendidos em 50 µL de água DEPC e armazenados a -80 °C. Uma eletroforese em gel de agarose foi feita para a observação do RNA sob luz ultravioleta. As amostras foram quantificadas utilizando o equipamento NanoVue (GE, EUA).

## **6. RT-PCR do genoma completo**

A reação de transcrição reversa e a reação de PCR, com o RNA extraído do vírus pré-purificados, foram conduzidas utilizando o RNA LA PCR Kit (AMV) Ver. 1.1 (Takara Bio Inc.®, Japão), no laboratório de biotecnologia vegetal da TMG. Para a reação de transcriptase reversa, foi utilizado 200 ng do RNA viral, juntamente com 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X RNA PCR Buffer, 1 mM de dNTP Mixture, 1 U de RNase Inhibitor, 0,25 U de Reverse Transcriptase (AMV RTase), 1,0 µM de Oligo dT-Adaptor *Primer* e

água destilada livre de RNase para se completar um volume final de 10 µL por amostra. As amostras foram incubadas em termociclador a 42 °C por 30 min, 99 °C por 5 min e 70 °C por 15 min.

Em seguida, a reação de PCR foi feita no mesmo tubo, onde foram acrescentados 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X LA PCR Buffer II, 1,25 U de Takara LA Taq, 0,2 µM de Random 9 mers *Primer*, 0,2 µM de Oligo dT-Adaptor *Primer*, acrescentando-se água destilada esterilizada, totalizando 50 µL por reação. As reações foram incubadas em termociclador a 94 °C por 2 min para desnaturação inicial, seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 61 °C por 1 min e 72 °C por 6 min, e por fim, 72 °C por 30 min.

As ampliações dos produtos de PCR foram visualizadas em gel de agarose a 1% sob luz UV.

Os produtos de PCR foram precipitados e purificados por meio da adição de 10% do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, e duas vezes o volume de etanol 100%, mantidos a -20 °C por uma noite. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 14.000g por 30 min a 4 °C. Após, os precipitados secaram em temperatura ambiente por aproximadamente 20 min, sendo a seguir resuspendidos em 20 µL de água e quantificados no NanoVue (GE, EUA).

## **7. Sequenciamento de nova geração do genoma viral**

O produto de PCR purificado foi selecionado das quatro amostras provenientes da extração por TRIzol® (Life Technologies, EUA) nas concentrações de 25% e 50% e por Fenol nas concentrações de 50% e 100%, com base nas imagens de eletroforese e nos dados de quantificação pelo NanoVue. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, em Piracicaba, SP, utilizando o equipamento Illumina MiSeq, EUA. Primeiramente as amostras foram quantificadas com o Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies, EUA), e diluídas para a concentração de 0,2 ng/µL. Após diluídas, as amostras foram preparadas com o Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, EUA), conforme as recomendações técnicas do fabricante, seguindo os passos do guia de preparo das amostras.

## **8. Análise de dados e montagem do genoma**

Os dados obtidos pelo HiScanSq (Illumina, EUA) foram analisados em quatro etapas principais. Na etapa de obtenção dos dados brutos foi utilizado o software

CASAVA 1.8.2 fornecido pela Illumina, que faz o *base call* dos dados brutos e os transforma em *reads* no formato fastq acompanhados dos valores de qualidade phred. Os *reads* foram visualizados utilizando o programa FastQC ([www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/](http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/)). A filtragem dos *reads* de baixa qualidade, sequências de adaptadores e vetores foi realizada pelo programa Seqclean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>), utilizando como *cutoff* bases com qualidade inferior a 24 QScore. A base de dados de contaminantes usada foi a Univec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Após filtragem, os *reads* com comprimento inferior a 65 pb foram removidos.

Na montagem *de novo*, os *reads* que passaram pelo controle de qualidade foram utilizados no software VICUNA v. 1.3 (YANG et al., 2012), desenvolvido pelo Broad Institute, para a montagem *de novo* de genomas virais (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/viral-genomics/vicuna>). Os parâmetros utilizados foram os *default* do programa, exceto o tamanho de kmer que foi de 25 pb, com span mínimo de 80 pb. Para juntar os *contigs*, o mínimo de similaridade entre as sequências foi estabelecido em 90%.

## 9. Anotação do genoma

A anotação do genoma viral ocorreu por meio das predições baseadas nas ORFs encontradas. Por se tratar de poliproteínas, foi utilizado o software OrfFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/gorf.html>) associado ao Transdecoder (v16/01/2014; <http://transdecoder.sourceforge.net/>). As sequências foram submetidas à anotação usando o programa Interproscan (v5.3 46, <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/17/9/847.abstract/>), que anota utilizando diversas bases de dados, como Pfam, GO e Kegg.

A predição dos sítios de clivagem e também das proteínas formadas em cada ORF foi baseada em similaridades de tamanho e homologia com sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de outras espécies do gênero *Comovirus*, depositadas no GenBank, por meio de alinhamentos utilizando a plataforma BLAST e CLUSTAL W, e também comparando-se com sequências de aminoácidos depositadas no UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) manualmente anotadas e revisadas (Swiss-Prot) ou analisadas computacionalmente (TrEMBL).

A massa molecular das poliproteínas e dos polipeptídeos foi calculada utilizando o programa ExPasy Compute PL/Mw tool, disponível em [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/).

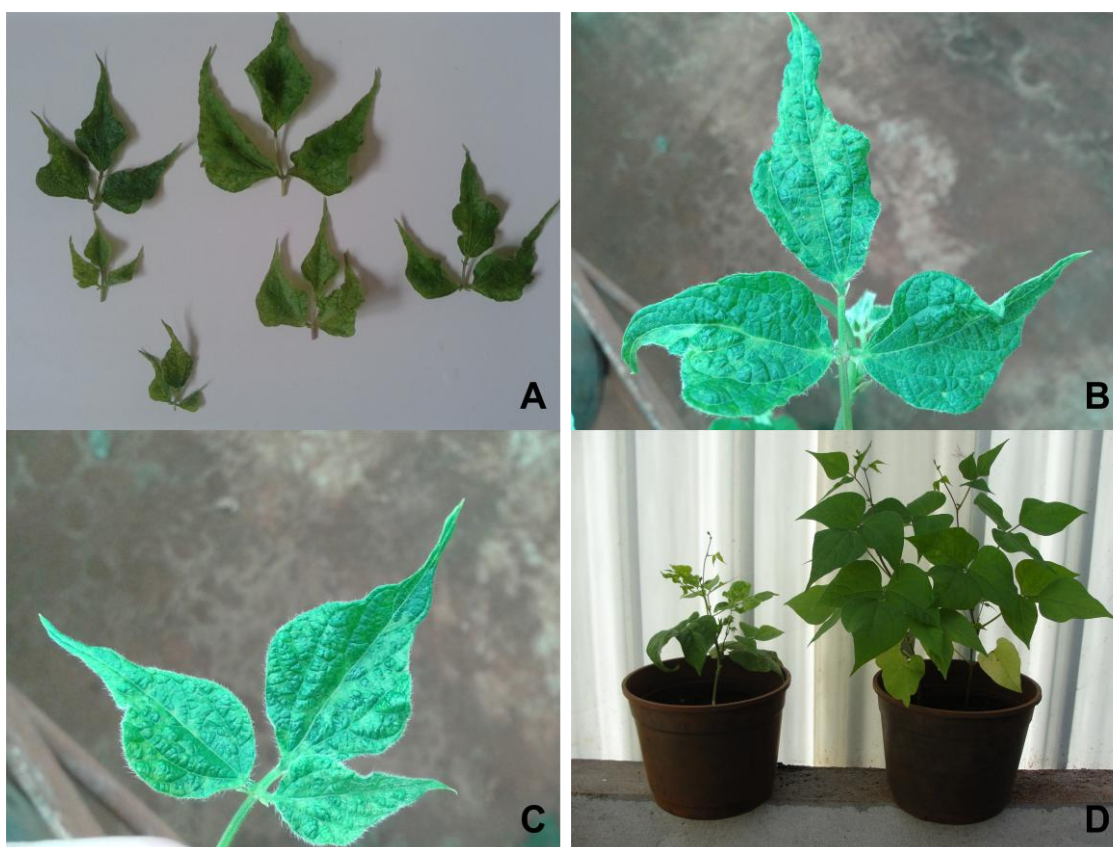
### **10. Análises filogenéticas**

Alinhamentos múltiplos utilizando a sequência de aminoácidos do isolado do vírus e de outros comovírus foram utilizadas para comparações entre a similaridade de cada proteína. Árvores filogenéticas foram construídas utilizando o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013), com base na filogenia predita pelo algoritmo *Neighbor-Joining Tree*, com *bootstrap* de 1.000 repetições. Para a construção das árvores, foram analisadas as regiões conservadas da protease e polimerase presentes no RNA1 dos vírus analisados, e também a região da capa proteica (LCP e SCP), visto que estas regiões são utilizadas como critério de demarcação entre espécies do gênero *Comovirus*. Para fins de comparação, também foram montadas árvores levando em consideração a poliproteína completa do RNA1 e também do RNA2 de *Comovirus*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Identificação do isolado viral

O isolado viral estudado, quando inoculado em plantas de feijão da cultivar Rio Tibagi, induziu sintomas de mosaico, formação de bolhas, leve deformação foliar e redução do porte da planta, como podem ser observados na Figura 2. Os sintomas se iniciaram entre 15 a 20 dias após a inoculação.



**Figura 2** Sintomas de infecção do isolado viral em estudo em feijão cultivar Rio Tibagi, após 30 dias de inoculação com tampão fosfato de sódio. (A), (B) e (C) Sintomas de mosaico, formação de bolhas e deformação foliar; (D) Diminuição do porte da planta infectada (esquerda), comparada com uma planta sadia (direita), com a mesma idade.

#### 1.1 Teste de dupla-difusão em ágar

No teste de dupla-difusão em ágar, os cinco antissoros testados reagiram com extrato de plantas inoculadas com o vírus, formando linhas de precipitação entre estes materiais e os antissoros. Nenhuma formação pode ser observada nas amostras sadias.

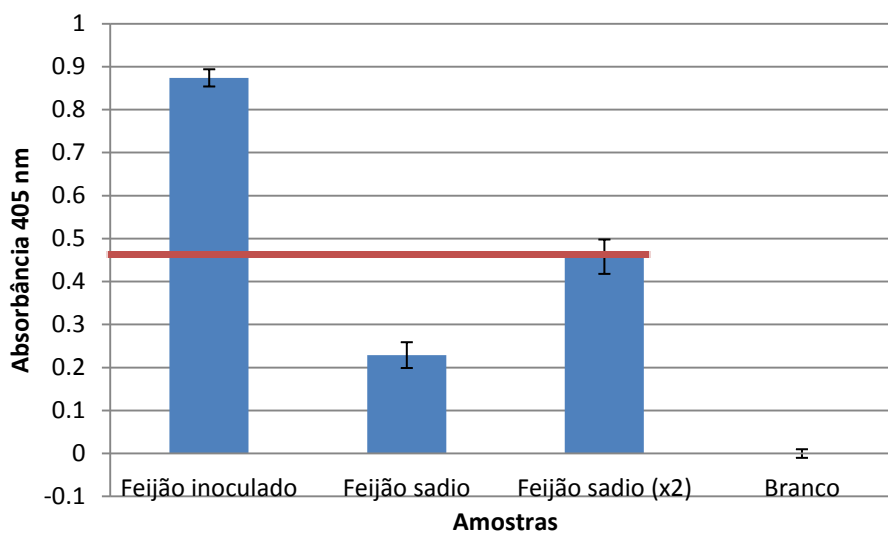
Estes resultados indicaram que todos os antissoros testados foram capazes de reagir e identificar as amostras positivas, inoculadas com o isolado em questão, possivelmente o BRMV.

### 1.2. Teste de ELISA indireto

O teste de ELISA indireto, com o antissoro para *Potyvirus* foi negativo, com as amostras de feijoeiros inoculados, ao passo que as amostras de melancia inoculadas com o *Potyvirus* reagiram positivamente. Deste modo, foi eliminada a possibilidade da co-infecção pelo BCMV e BYMV, dois potyvírus comuns em feijoeiro. As amostras foram consideradas positivas quando a média das três repetições atingiram um valor de absorbância igual ou superior à média das amostras sadias, vezes dois. O desvio padrão foi calculado por meio dos valores das três repetições por amostra.

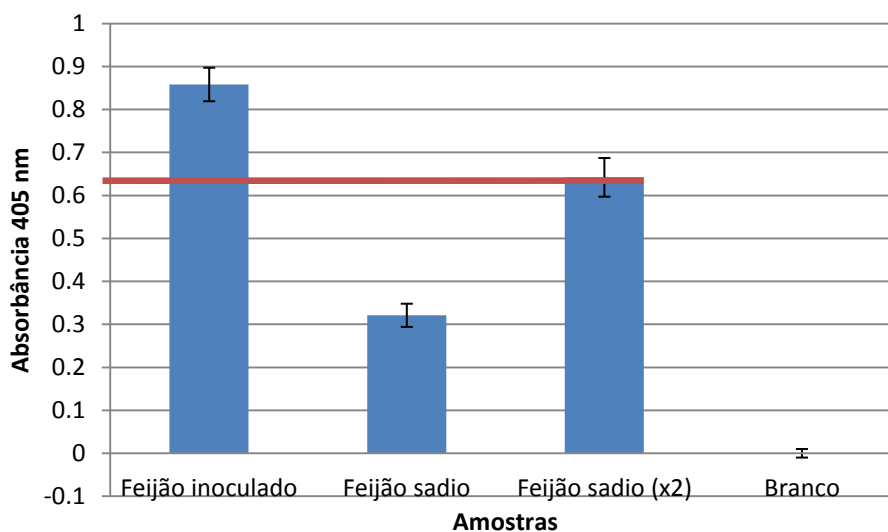
Os dois antissoros para comovírus testados, mostraram-se eficientes para a detecção deste vírus, conforme ilustrado nas Figuras 3 e 4, a seguir:

**Figura 3** Gráfico do resultado do teste de ELISA indireto utilizando “antissoro Vírus do mosaico em desenho”



Linha vermelha indicando o valor de corte para amostras infectadas (acima da linha) e sadias (abaixo da linha), baseando-se no valor de absorbância do controle negativo, vezes dois.

**Figura 4** Gráfico do resultado do teste de ELISA indireto utilizando “antissoro Vírus do mosaico rugoso”



Linha vermelha indicando o valor de corte para amostras infectadas (acima da linha) e sadias (abaixo da linha), baseando-se no valor de absorbância do controle negativo, vezes dois.

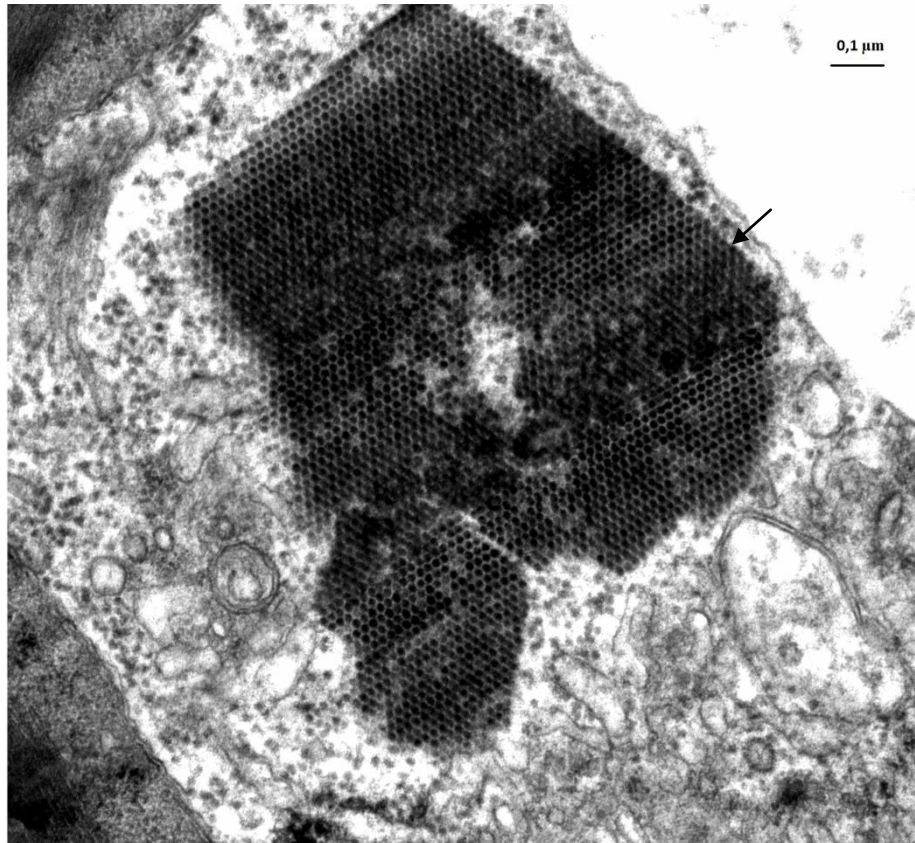
### 1.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Exames de microscopia eletrônica de transmissão a partir de folhas infectadas de feijão cultivar Rio Tibagi revelaram a presença de prováveis partículas virais de forma isométrica, com diâmetro aproximado de 28 a 30 nm, apresentando um padrão de inclusões citoplasmáticas cristalinas (Figura 5).

Os RNAs dos comovírus são encapsulados separadamente em partículas capsidiais icosaédricas de diâmetro variando entre 25-35 nm (SANFARÇON et al., 2009), com média de aproximadamente 28 nm (CHEN & BRUENING, 1992).

O vírus em estudo apresenta similaridade com os resultados relatados por Acosta et al. (1986), que em exames de microscopia eletrônica revelaram partículas hexagonais de BRMV, com média de diâmetro de 30 nm. Os resultados de microscopia eletrônica revelaram uma alta concentração viral nos tecidos vegetais analisados.





**Figura 5** Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão de preparações de folhas de feijão da cultivar Rio Tibagi infectadas, por meio do método de cortes ultrafinos, mostrando prováveis partículas virais (seta) (Realizado pelo Prof. Dr. E. W. Kitajima).

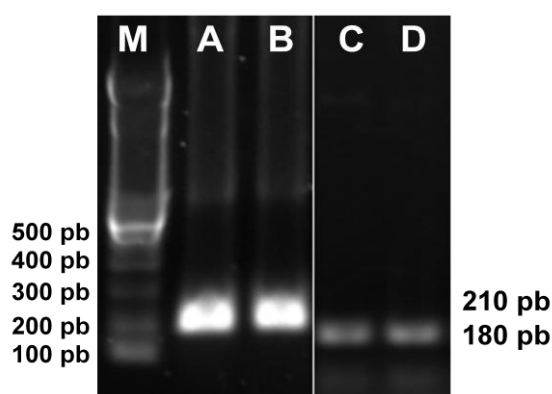
#### **1.4. Transmissão por vetores (*Diabrotica speciosa*)**

O teste de transmissão por vetores, utilizando espécies de *Diabrotica speciosa*, revelou que o vírus pode ser transmitido por estes insetos, visto que as plantas apresentaram os mesmos sintomas de infecção viral, aproximadamente 30 dias após a retirada dos insetos. A transmissão ocorreu em 40% das plantas testadas (seis plantas foram infectadas, do total de quinze que receberam os insetos virulíferos). Estes resultados foram confirmados por teste de ELISA indireto.

Resultados semelhantes foram descritos por Castillo-Urquiza et al. (2006), que descreveram uma transmissão de 33% do BRMV em plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro, utilizando besouros da espécie *Cerotoma arcuatus*, pertencentes à mesma família que os vetores *Diabrotica speciosa*.

### 1.5. RT-PCR de sequências parciais

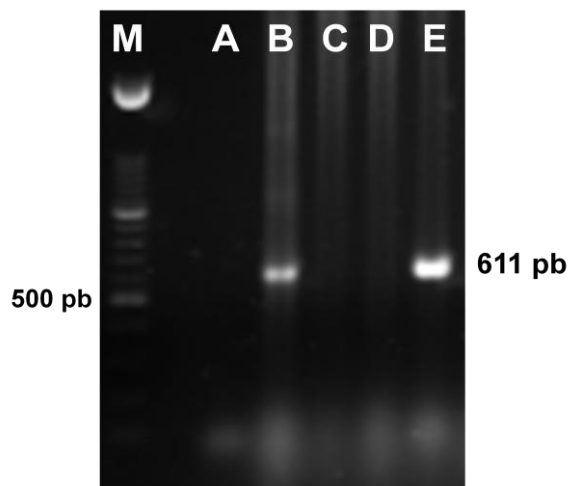
A detecção molecular, por meio de reação de RT-PCR utilizando os *primers* descritos na Tabela 1, apresentaram resultados satisfatórios, resultando bandas do tamanho esperado em eletroforese em gel de agarose. Ou seja, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados amplificaram fragmentos dos dois RNAs do isolado viral estudado, conforme demonstrado nas Figuras 6 e 7.



**Figura 6** Eletroforese em gel de agarose do produto de RT-PCR utilizando plantas infectadas com o isolado viral em estudo. Os *primers* “BRMV RNA1” amplificaram fragmentos de 210 pb (A) e (B), e os *primers* “BRMV RNA2” amplificaram fragmentos de 180 pb (C) e (D). M: Marcador molecular DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder) (Roche®, Suíça).

Os fragmentos amplificados, após sequenciados, foram comparados com a sequência do genoma de outros comovírus já sequenciados. Quando utilizados os *primers* “BRMV RNA1”, os fragmentos sequenciados das seis amostras apresentaram uma identidade variando entre 94 e 99% com as sequências do genoma parcial do isolado da Embrapa do BRMV (Acesso GenBank GU205154.2). As sequências dos fragmentos amplificados com os *primers* “BRMV RNA2” de quatro amostras, tiveram uma identidade de 96 a 100% com a sequência parcial do RNA2 deste vírus (Acesso GenBank AF263548.2). Com os *primers* “Comovirus RNA1”, a identidade da sequência do fragmento amplificado das seis amostras utilizadas foi de 95 a 99% com a sequência parcial do isolado da Embrapa do BRMV (Acesso GenBank GU205154.2). Porcentagens de identidade menores, chegando até a 72% foram observadas em todas as

amostras sequenciadas, quando comparadas com sequências de outros comovírus já sequenciados.



**Figura 7** Eletroforese em gel de agarose do produto de RT-PCR utilizando os *primers* “ComovirusRNA1” com plantas infectadas com BRMV (B) e (E); plantas sadias (C) e (D); e branco (A). M: Marcador molecular DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder) (Roche®, Suíça).

Com base nos testes sorológicos de dupla-difusão em ágar e do teste de ELISA realizados, na transmissão por besouros crisomelídeos e nos testes moleculares de RT-PCR e sequenciamento deste material, foi confirmada a identificação do isolado chamado de Paraná do *Bean rugose mosaic virus*.

## 2. Gama de hospedeiras

Das 29 cultivares de soja testadas, 11 apresentaram sintomas de infecção viral, conforme Tabela 2. Os sintomas predominantes foram de mosaico nas folhas, e em alguns casos formação de bolhas e deformação foliar (Figura 9). As análises de ELISA Indireto (Figura 8) e de RT-PCR, em amostras foliares das mesmas cultivares confirmaram a infecção pelo isolado do BRMV.

Conforme descrito por Cupertino (1982), os sintomas do BRMV em soja variam de acordo com a cultivar, em geral incluindo mosaico, formação de bolhas e encrespamento foliar, com redução do porte da planta. De acordo com Gasparin et al. (2005), a cultivar Santa Rosa não apresentou sintomas quando inoculada

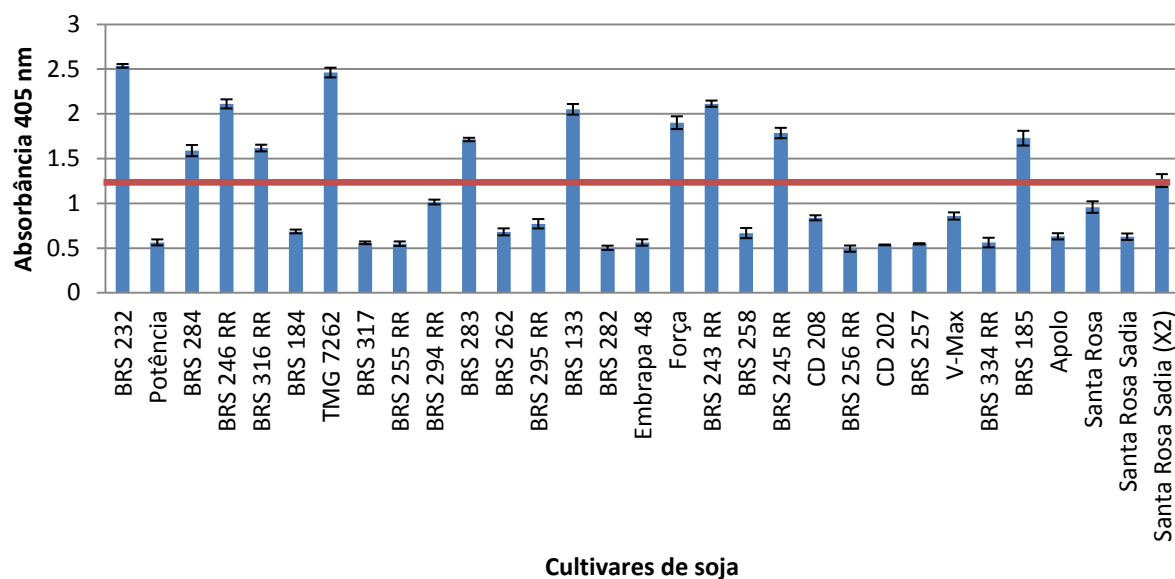
mecanicamente com um isolado do BRMV, o que também pode ser observado com o isolado testado neste trabalho, ao inoculá-lo na cultivar Santa Rosa.

**Tabela 2** Gama de hospedeiras do isolado viral em cultivares de soja (*Glycine max*)

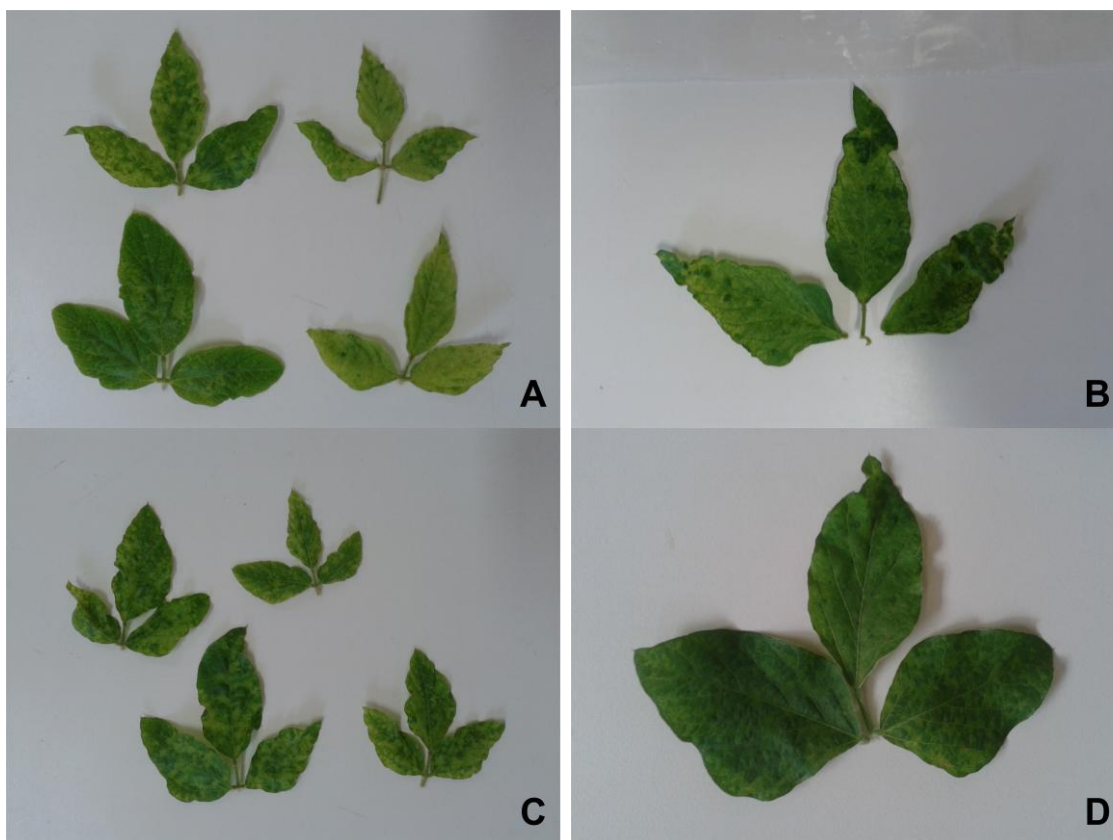
<b>Cultivar</b>	<b>Sintomas</b>
V-Max	-
Potência	-
Força	m
Apolo	-
CD 202	-
CD 208	-
TMG 7262 RR	m
Embrapa 48	-
BRS 133	cl, mb
BRS 184	-
BRS 185	m
BRS 232	cl, mb, df
BRS 257	-
BRS 258	-
BRS 262	-
BRS 282	-
BRS 283	cl, mb, df
BRS 284	mb
BRS 317	-
BRS 243 RR	cl, mb, df
BRS 245 RR	mb
BRS 246 RR	mb, df
BRS 255 RR	-
BRS 256 RR	-
BRS 294 RR	-
BRS 295 RR	-
BRS 316 RR	cl, mb
BRS 334 RR	-
Santa Rosa	-

Onde: cl: clorose, df: deformação foliar, b: formação de bolhas, m: mosaico, mb: mosaico com bolhas, e -: ausência de sintomas.

**Figura 8** Gráfico do resultado do teste de ELISA indireto em cultivares de soja inoculadas com o isolado viral, utilizando o “antissoro Vírus do mosaico em desenho”



Linha vermelha indicando o valor de corte para amostras infectadas (acima da linha) e sadias (abaixo da linha), baseando-se no valor de absorbância do controle negativo, vezes dois.



**Figura 9** Sintomas de infecção do isolado viral estudado em cultivares de soja, após 30 dias de inoculação com tampão fosfato. (A) BRS 232; (B) BRS 243 RR; (C) BRS 246 RR; (D) TMG 7262 RR.

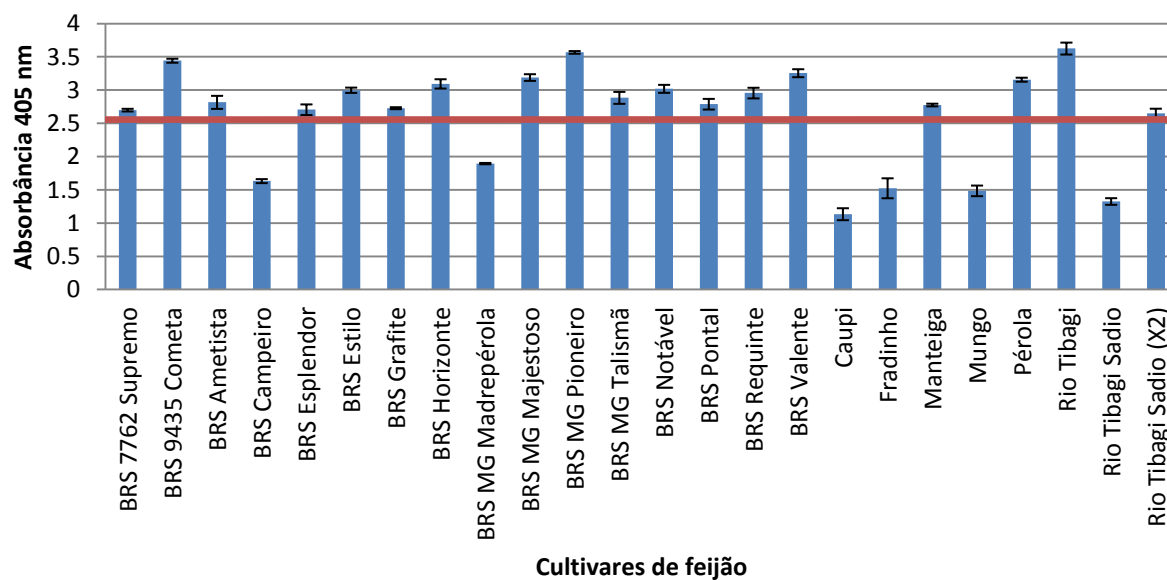
Das 22 cultivares de feijão testadas neste trabalho, 17 desenvolveram sintomas de infecção, após inoculação mecânica experimental com o isolado estudado (Tabela 3). Os sintomas predominantes em feijoeiro foram clorose, deformação foliar, formação de bolhas e mosaico, variando de acordo com cada cultivar (Figura 11). Os resultados obtidos no teste de gama de hospedeiras ratificaram aqueles obtidos no teste de ELISA indireto (Figura 10) e RT-PCR.

**Tabela 3** Gama de hospedeiras do isolado viral em cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*)

<b>Cultivar</b>	<b>Sintomas</b>
BRS 7762 Supremo	mb
BRS 9435 Cometa	mb, df
BRS Ametista	mb
BRS Campeiro	-
BRS Esplendor	m
BRS Estilo	mb, df
BRS Grafite	mb
BRS Horizonte	mb
BRS MG Madrepérola	-
BRS MG Majestoso	mb, df
BRS MG Pioneiro	cl, mb, df
BRS MG Talismã	mb
BRS Notável	cl, mb
BRS Pontal	mb
BRS Requinte	mb
BRS Valente	cl, mb
Caupi	-
Fradinho	-
Manteiga	cl, m
Mungo	-
Pérola	mb
Rio Tibagi	mb, df

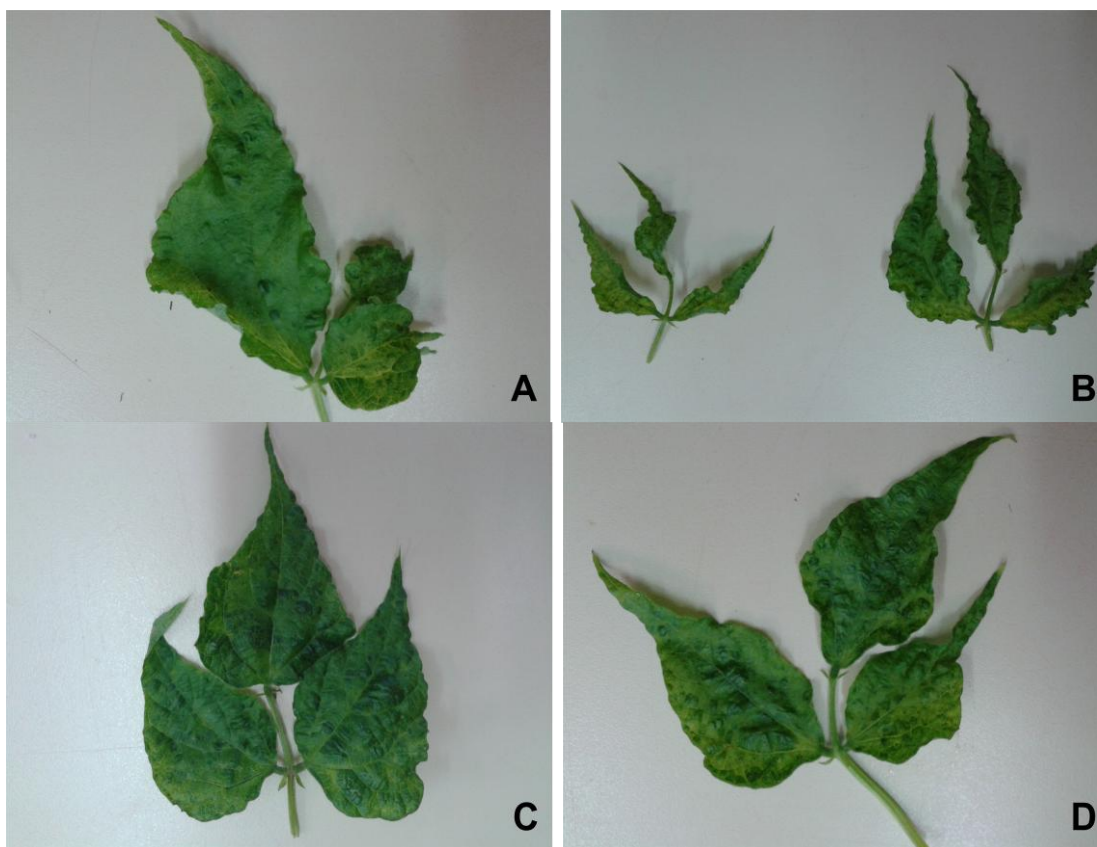
Onde: cl: clorose, df: deformação foliar, b: formação de bolhas, m: mosaico, mb: mosaico com bolhas, e -: ausência de sintomas.

**Figura 10** Gráfico do resultado do teste de ELISA indireto em cultivares de feijão inoculadas com o isolado viral, utilizando o “antissoro Vírus do mosaico em desenho”



Linha vermelha indicando o valor de corte para amostras infectadas (acima da linha) e sadias (abaixo da linha), baseando-se no valor de absorbância do controle negativo, vezes dois.



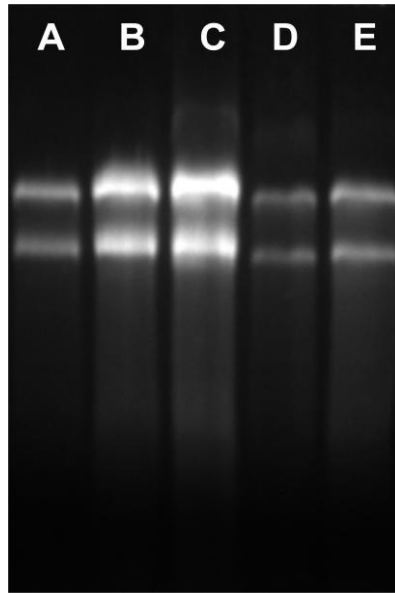


**Figura 11** Sintomas de infecção do isolado estudado em cultivares de feijão, após 30 dias de inoculação com tampão fosfato. (A) BRS 9435 Cometa; (B) BRS MG Pioneiro; (C) BRS Valente; (D) Pérola.

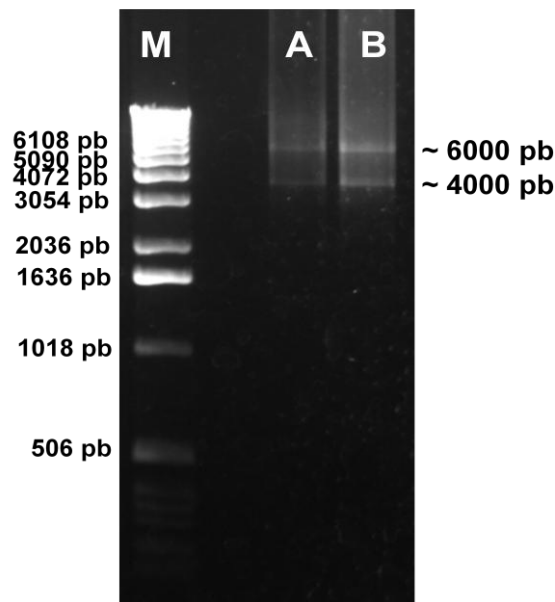
### 3. Pré-purificação, extração de RNA e RT-PCR

A purificação parcial do vírus possibilitou uma ótima extração de RNA com resultados satisfatórios a partir dos métodos de extração utilizados (TRizol® e fenol). A qualidade das extrações obtidas foram evidenciadas por meio de eletroforeses em gel de agarose a 1%, evidenciando a presença de duas bandas, que corresponderam ao RNA1 e RNA2 do isolado do vírus em questão (Figura 12).

Os dois fragmentos do genoma viral foram amplificados por RT-PCR com os iniciadores Oligo-dT e *primers* randômicos. Todavia, a concentração do DNA amplificado foi baixa, com base na intensidade das bandas obtidas.



**Figura 12** Eletroforese em gel de agarose do RNA extraído a partir do isolado viral parcialmente purificado, utilizando protocolo descrito por Wellink, 1998, com concentrações virais de 25% (A), 50% (B) e 100% (C) e com o reagente TRIzol® (Life Technologies, EUA), nas concentrações virais de 25% (D) e 50% (E).



**Figura 13** Eletroforese em gel de agarose do produto de RT-PCR utilizando amostras extraídas de acordo com protocolo descrito por Wellink, 1998, com concentrações virais de 50% (A) e 100% (B). M: Marcador Molecular DNA Molecular Weight Marker X (1 kb ladder) (Roche®, Suíça).

O padrão de bandas evidenciado na Figura 13 poderia representar o RNA1 e RNA2 do vírus. Por meio de comparações com o tamanho das bandas fornecido pelo marcador molecular (DNA Molecular Weight Marker X – Roche®, Suíça), estima-se que o tamanho do genoma viral seja de aproximadamente 6.000 pb para a molécula de RNA1 e de 4.000 pb para a molécula de RNA2.

De acordo com Goldbach & Wellink (1996), o genoma do *Cowpea mosaic virus*, a espécie tipo do gênero *Comovirus*, é composto por uma molécula de 5.889 pb do RNA1 e outra de 3.481 pb do RNA2. Analisando as espécies de comovírus já sequenciadas e depositadas no GenBank, conclui-se que a maioria delas possui genoma com moléculas do RNA1 variando entre 5.865 e 6.084 pb e moléculas de RNA2 entre 3.354 e 4.026 pb.

#### 4. Sequenciamento, análise de dados, montagem e anotação do genoma

Após precipitados e purificados, os produtos da PCR foram sequenciados. Conforme Tabela 4, o trabalho de montagem do genoma gerou uma quantidade satisfatória de dados.

**Tabela 4** Dados referentes à montagem do genoma do vírus após sequenciamento

Amostra	Nº reads total	Nº reads após filtragem (QS>24 e retirando contaminantes)	Tamanho médio dos contigs	Contig mais longo	Nº contigs	Nº reads utilizados no assembly do maior contig
BRMV 1	537070	327728	1029	6163	15	163010
BRMV 2	274616	194652	1440	6170	9	93701

Assumiu-se que os dois contigs maiores de cada amostra, ou seja, 6.163 pb e 4.160 pb obtidos na amostra BRMV1 e 6.170 pb e 3.876 pb para a amostra BRMV2 seriam, respectivamente, referentes ao RNA1 e RNA2 do vírus. Os demais contigs, seriam resultado de montagens (*assemblies*) menores, mas também contendo fragmentos com grande homologia entre si, e com os dois fragmentos maiores.

Quando comparadas com sequências de outros comovírus depositadas no GenBank, estas sequências apresentaram similaridade principalmente com o BPMV, apresentando regiões bastante conservadas com este vírus, principalmente nas posições entre as bases 700 e 2.300, e também nas posições entre 3.700 e 4.200 do RNA1, com valor maior ou igual a 200. Estas regiões seriam responsáveis pela codificação das

proteínas VPg e RdRp, respectivamente, baseando-se nos estudos de anotação, mediante comparação com outras espécies de comovírus já anotadas. Estas são as regiões mais conservadas entre os RNA1 de *Comovirus*.

Quando a sequência referente ao RNA2 foi comparada com sequências de outros comovírus, observou-se que a maior similaridade obtida também foi com o BPMV, aproximadamente entre as bases de número 1.000 e 1.700, com valores também superiores a 200. Conclui-se que esta região, com base nos estudos de anotação por comparação com outros comovírus já anotados, codificaria as proteínas MP e LCP, também bastante conservadas entre as espécies deste gênero de vírus.

## 5. Caracterização genômica

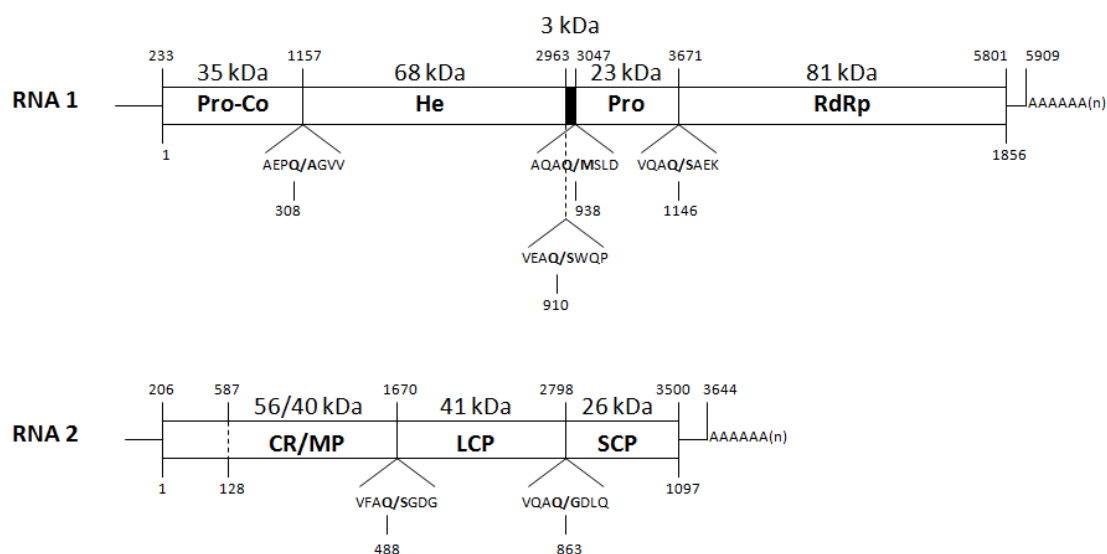
Como em outras espécies de *Comovirus*, o genoma completo do BRMV consiste de dois RNAs de senso positivo, de fita simples poliadenilados (Figura 14). O RNA1 do isolado Paraná do BRMV é composto de 5.909 nucleotídeos, enquanto o RNA2 possui 3.644 nucleotídeos, ambos excluindo a cauda poli A. O BRMV RNA1 possui uma região 5' não traduzida de 232 nucleotídeos, ao passo que o RNA2 possui 205. A região 3' não traduzida do RNA1 contém 106 nucleotídeos após o códon de terminação, esta mesma região no RNA2 apresenta 142 nucleotídeos. A região 5' de ambos RNAs iniciam-se com a sequência UAUUAAU, característica dos comovírus (CHEN & BRUENING, 1992; DI et al., 1999; KOMATSU et al., 2007; KHANDEKAR et al., 2009).

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do RNA1 e do RNA2 referentes ao isolado Paraná do *Bean rugose mosaic virus* estudado neste trabalho, foram depositadas no GenBank e estão disponíveis sob os números de acesso KP404602 e KP404603, respectivamente.

O códon de início no RNA1 está localizado no nucleotídeo de posição 233, e o último nucleotídeo do códon de terminação está na posição 5.801, codificando uma única ORF de 1.856 aminoácidos, com massa molecular calculada em 210 kDa.

O códon de início no RNA2 está na posição 206 nt, enquanto que o último nucleotídeo do códon de terminação está localizado no nucleotídeo de número 3.500. O RNA2 contém outro códon de metionina (de início) na posição 381 nt. É possível que a tradução se inicie neste códon, bem como produza uma proteína N-terminal truncada característica de comovírus (HULL, 2002). A poliproteína do RNA2 pode ter então 1.097 aminoácidos de comprimento ou 970, dependendo de qual códon de início é

usado, resultando em uma poliproteína com massa molecular calculada de 123 kDa ou 107 kDa, respectivamente.



**Figura 14** Organização genômica do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). O genoma consiste de dois RNAs: RNA1 e RNA2. As caixas indicam as regiões codificantes das proteínas preditas: *Pro-Co* protease cofator, *He* RNA helicase, *caixa preta* virus protein genome-linked (VPg), *Pro* protease, *RdRp* RNA-dependent RNA polymerase, *CR/MP* replicase cofator/movement protein, *LCP* large coat protein, *SCP* small coat protein, *linhas horizontais* regiões 5' e 3' não traduzidas, AAAAAA<sub>(n)</sub> cauda poliA. Massas moleculares calculadas estão listadas acima das regiões de cada proteína; *números acima das caixas* indicam as posições na sequência de nucleotídeos, enquanto que os *números abaixo* indicam as posições na sequência de aminoácidos. Os três aminoácidos em cada lado dos sítios de clivagem preditos (em negrito) são mostrados abaixo dos sítios nas poliproteínas, e a posição dos aminoácidos na poliproteína é indicada.

Em nenhum dos códons de início deste vírus, pode ser encontrado o contexto da sequência consenso favorável para iniciação proposto por Kozak, (A/G XX AUG G, onde X pode ser qualquer aminoácido), a não ser pelas bases purinas (A ou G) na posição -3, encontradas tanto no códon de início do RNA1 quanto nos dois códons do RNA2. No RNA2, o segundo códon de início (GAATATGC) está num contexto mais favorável do que o primeiro (TGATATGT), o que condiz com trabalhos publicados por Khandekar et al. (2009) e Komatsu et al. (2007) para outros comovírus.

Baseado na identidade de sequências de outros comovírus, processos proteolíticos da poliproteína do RNA1 do BRMV geram cinco polipeptídeos: protease cofator (Pro-Co), RNA helicase (He), VPg, protease (Pro), e RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), com massa molecular calculada em 35, 68, 3, 23 e 81 kDa, respectivamente. O domínio da helicase predito contém uma região correspondente à motif da helicase (família de proteína motif número 00910; pfam00910), como predito na busca de domínios conservados no NCBI – National Center for Biotechnology Information (MARCHLER-BAUER et al., 2005).

A sequência de aminoácidos predita da Pro-Co possui a *motif* FX<sub>27</sub>WX<sub>11</sub>LX<sub>21</sub>LX<sub>1</sub>E (onde X pode ser qualquer aminoácido), que está envolvida em funções Pro-Co (RITZENTHALER et al., 1991; KOMATSU et al., 2007). A região da He contém as três *motifs* conservadas ligadas a nucleotídeos trifosfatados (NTP-binding) “A”, “B” e “C”, que são identificados nas helicases de vírus de RNA de senso positivo da superfamília 3 (GORBALENYA et al., 1990; DI et al., 1999; KOMATSU et al., 2007). A região da VPg contém a *motif* E/DX<sub>1-3</sub>YX<sub>3</sub>NX<sub>4-5</sub>R, que é conservada na família *Comoviridae* (MAYO & FRITSCH, 1994), exceto pela ausência de um dos aa D ou E no início da *motif*. A região da Pro analisada possui os aminoácidos conservados His40, Glu76 e Cys166 que podem constituir a tríade catalítica para proteases (GORBALENYA et al., 1989; DESSENS & LOMONOFF, 1991; DI et al., 1999). A RdRp contém as oito *motifs* conservadas (Ia-VIII) localizadas na porção central deste gene, características de vírus de RNA de senso positivo propostas por Koonin et al. (1991), e que também foram encontradas em trabalhos de Di et al. (1999); Petrzik et al. (2005) e Komatsu et al. (2007). Esta proteína contém a sequência GDD de aminoácidos que, de acordo com Hull (2002), desempenha um papel na catalização da reação da polimerase.

Processos proteolíticos da poliproteína do RNA2 do BRMV podem gerar quatro potenciais polipeptídeos de 56 kDa (aminoácidos 1-488) ou 40 kDa (aa 128-488), dependendo de qual códon de início é usado, formando replicase cofator e proteína de movimento, além da *Large coat protein* de 41 kDa (aa 489-862) e *Small coat protein* de 26 kDa (aa 863-1097). A poliproteína de 56 kDa contém a proteína completa de 40 kDa em sua posição C-terminal. Em outros comovírus, proteínas com a mesma locação genômica daquela de 56 kDa, funcionam como um cofator necessário para a replicação do RNA2 (CR), enquanto aquelas que na posição da proteína de 40

kDa são proteínas de movimento (MPs) (GOLDBACH & WELLINK, 1996; HULL, 2002).

No RNA2, cada proteína contém domínios e *motifs* características dos comovírus. A região *N*-terminal CR (126 aa) é a região menos conservada e a mais hidrofóbica da poliproteína do RNA2 dos comovírus (CHEN & BRUENING, 1992). A MP do vírus em estudo apresenta a possível *motif* NTP-binding (LXDX<sub>14</sub>VTX<sub>4</sub>GK) dos comovírus que pode estar envolvida na movimentação viral (HOLNESS et al., 1989), modificado apenas na região dos aa VT desta *motif*, onde foram encontrados os aminoácidos VS. Na região da LCP, os domínios conservados comparados por identidade de aa compartilharam homologia com membros da superfamília LCP dos comovírus (pfam02247), bem como na região da SCP, em que pode ser observada homologia com a superfamília deste mesmo gene (pfam002248). A massa molecular da LCP (41 kDa) está de acordo com a massa molecular previamente descrita para esta proteína, de aproximadamente 40 kDa (RAJAKARUNA et al., 2007).

Como em outras espécies de comovírus, é predito que as duas poliproteínas devem ser clivadas por uma proteinase codificada pelo vírus (KHANDEKAR et al., 2009). Os sítios de clivagem propostos para estas poliproteínas as separam em proteínas baseando-se na similaridade de tamanhos e na significância da homologia entre as sequências de outros comovírus. Baseado em comparações com outras sequências de comovírus já anotadas, acredita-se que potenciais sítios de processos proteolíticos nas poliproteínas, para o RNA1 estão entre os aminoácidos Q/A, Q/S, Q/M e Q/S, para as proteínas Pro-Co/He, He/VPg, VPg/Pro e Pro/RdRp, respectivamente. Para o RNA2, tem-se que entre CR/MP e LCP, o sítio de clivagem seja Q/S, e entre a LCP e a SCP, seja Q/G. De acordo com Di et al. (1999), entre os genes da protease e polimerase, o sítio é altamente variável entre os comovírus: Q/G no RCMV e CPMV, Q/S no BPMV, Q/A no CPSMV. Similarmente ao BPMV, no BRMV nesta região o sítio é Q/S. Os mesmos autores citam que, embora entre Pro-Co e He, a maioria dos comovírus possuam Q/S como sítio de clivagem, o BPMV apresenta Q/A, como encontrado no isolado estudado. Os sítios entre a Helicase e VPg (Q/S) e entre a VPg e a Protease (Q/M) também são altamente conservados nos comovírus, como CPMV, BPMV, CPSMV e RCMV (DI et al., 1999; KOMATSU et al., 2007), o que pode ser observado também no BRMV-Paraná. Os aminoácidos glutamina (Q) na posição -1 e alanina nas posições -2 e -4 são conservados, além de que entre a Pro e a RdRp, tem-se a sequência Q (-1) A (-2) e Q (-3) (KOMATSU et al., 2007), que podem ser encontradas na

sequência deste isolado do BRMV. Resultados semelhantes para os sítios do RNA1 do BRMV também foram encontrados para o BPMV por Zhang et al. (2007). Quanto ao RNA2, Chen & Bruening, (1992), comparando os sítios de clivagem, citam que entre a CR/MP e a LCP a clivagem ocorre na posição Q/M para o BPMV e CPMV, e na posição Q/S para o CPSMV, como predito para o BRMV. Os mesmos autores citam que o sítio entre a LCP e a SCP ocorre em Q/G para os vírus RCMV e CPMV, semelhante à região predita para o BRMV neste trabalho.

Alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos com outras espécies do gênero *Comovirus* revelaram identidades mais altas entre a maioria das proteínas do BRMV e do BPMV (45-61%) (Tabela 5).

**Tabela 5** Identidade na sequência de aminoácidos (%) entre as proteínas do BRMV e de outras espécies do gênero *Comovirus*.

	Pro-Co	He	VPg	Pro	RdRp	CR/MP	LCP	SCP
APMV	-	-	-	-	49	34	37	34
BPMV	<b>45</b>	51	<b>53</b>	<b>55</b>	<b>59</b>	<b>49</b>	<b>61</b>	<b>54</b>
BBTMV	30	40	50	48	55	39	53	42
CPMV	29	40	45	46	54	35	53	44
CPSMV	41	<b>52</b>	49	47	54	43	56	49
RaMV	30	41	50	41	56	41	48	42
RCMV	28	41	48	46	55	34	54	46
SqMV	28	40	50	42	52	43	53	40

Valores mais altos estão em negrito.

Com base na mais recente atualização da classificação taxonômica da família *Secoviridae* (na qual inclui-se o gênero *Comovirus*) (SANFAÇON et al., 2011) já descritos, em que para que sejam consideradas espécies distintas, é necessário analisar a porcentagem da identidade da sequência de aa da CP e da região Pro-Pol conservada. Além disso, é preciso haver diferenças nas reações antigênicas entre as espécies, apresentar gama de hospedeiras e especificidade de vetor distintas, ausência de proteção cruzada e ausência de re-ordenação entre o RNA1 e RNA2. Contudo, segundo os mesmos autores, nem todos os critérios precisam ser encontrados simultaneamente. Em casos em que a porcentagem de identidade da sequência em uma ou nas duas sequências está próxima do limite de corte proposto, aí sim outros critérios devem ser considerados. Portanto, considerando-se que a máxima identidade obtida para a LCP do BRMV foi de 61%, e de 54% para a SCP de outra espécie já definida, então assume-se que o BRMV é uma espécie distinta dentro do gênero *Comovirus*.

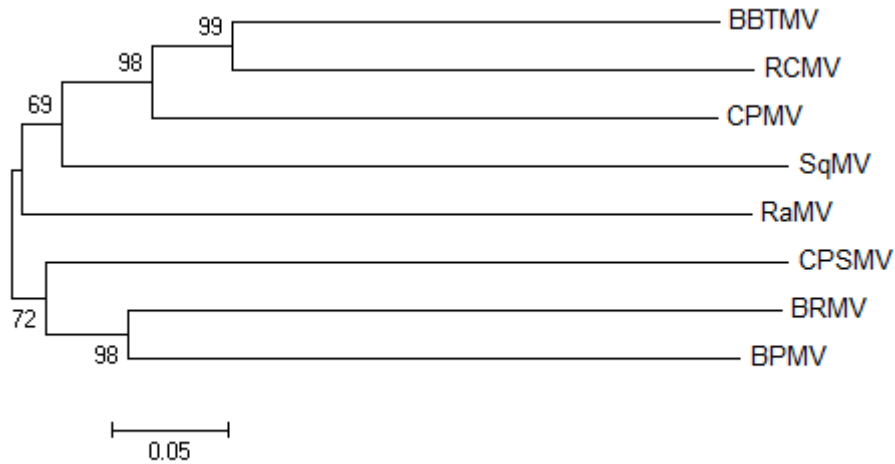


A importância de se conhecer o genoma completo do BRMV como também a determinação dos sítios de clivagens das proteínas resulta na possível utilização deste vírus como vetor na indução de silenciamento gênico. Trabalhos publicados por Cooper et al. (2013); Zhang & Ghabrial (2006); Zhang et al. (2010) utilizaram vetores provenientes do RNA2 recombinante do BPMV para indução de silenciamento gênico, onde inseriram os genes exógenos entre as regiões codificadoras da MP e da LCP.

Os VIGS descritos acima envolvem plantas de soja com BPMV recombinante expressando um pequeno fragmento de um gene da soja que se imagina estar envolvido na resistência à doença de um outro patógeno. Os VIGS são inseridos antes do teste de inoculação patogênica, e, se realizado com sucesso, induz o sistema de defesa mediado pelo RNA de interferência endógeno na planta e diminui a expressão do gene candidato. A redução concomitante na resistência após este desafio com o patógeno implica no gene silenciado de defesa (COOPER et al., 2013).

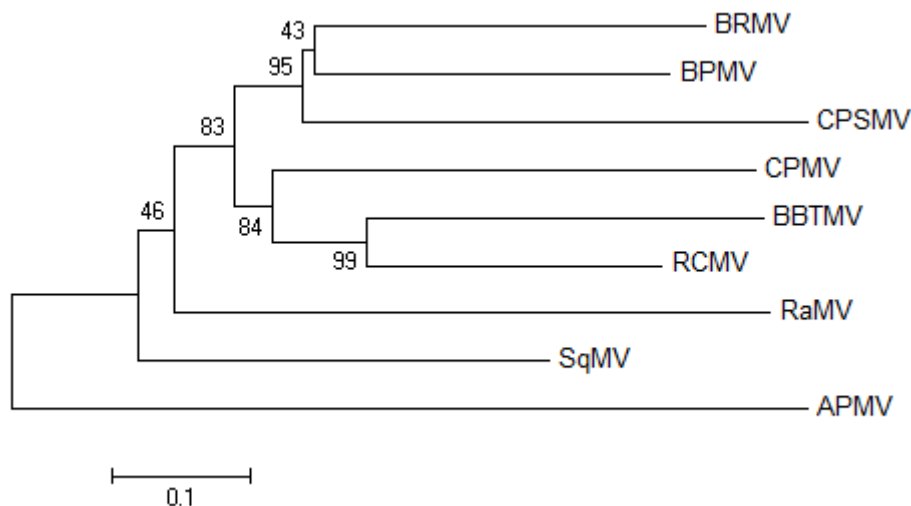
## **6. Análises filogenéticas**

Analisando-se a árvore filogenética baseada na região conservada da protease e da polimerase do RNA1 dos comovírus (Figura 15), observa-se um agrupamento, no mesmo ramo, entre o BRMV e o BPMV, evidenciando que estas espécies seriam mais próximas. Neste mesmo galho, tem-se o CPSMV. Em um outro clado, no mesmo ramo estão agrupados o RCMV e o BBTMV, em seguida o CPMV e por último o SqMV. O RaMV formou um galho separado dos outros comovírus, indicando estar evolucionariamente mais distante, refletindo a diferença na gama de hospedeiras destes vírus, pois este último infecta espécies de crucíferas.



**Figura 15** Árvore filogenética baseada na comparação entre as sequências de aminoácidos da região conservada da protease e polimerase do RNA1 de espécies de *Comovirus*. Valores de bootstrap maiores que 50 estão denotados. Abreviações e números de acesso no GenBank: BBTMV, *Broad bean true mosaic virus*, NC\_022004; BPMV, *Bean pod mottle virus*, NC\_003496; BRMV, *Bean rugose mosaic virus*, KP404602; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NC\_003549; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NC\_003545; RaMV, *Radish mosaic virus*, NC\_010709; RCMV, *Red clover mottle virus*, NC\_003741; SqMV, *Squash mosaic virus*, NC\_003799.

A árvore filogenética baseada na região da LCP e SCP do RNA2 dos comovírus (Figura 16) revelou também uma relação mais próxima entre o BRMV e o BPMV, seguido do CPSMV, em um ramo maior. Em um outro galho, agrupou-se o RCMV e o BBTMV, posteriormente com o CPMV. O RaMV, o SqMV e o APMV apresentaram ramificações diferentes, estando o RaMV mais próximo dos anteriores e o APMV mais distante geneticamente.



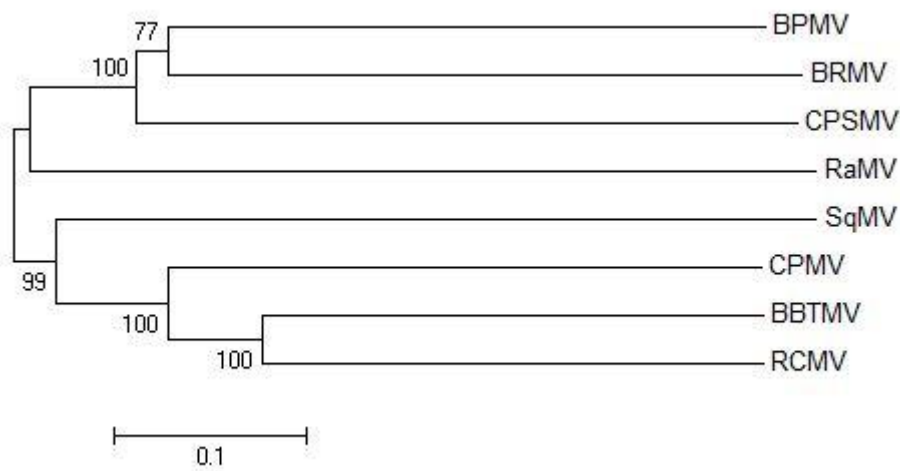
**Figura 16** Árvore filogenética baseada na comparação entre as sequências de aminoácidos da LCP e SCP do RNA2 de espécies de *Comovirus*. Valores de bootstrap maiores que 50 estão denotados. Abreviações e números de acesso no GenBank: APMV, *Andean potato mottle virus*, L16239; BBTMV, *Broad bean true mosaic virus*, NC\_022006; BPMV, *Bean pod mottle virus*, AY744933; BRMV, *Bean rugose mosaic virus*, KP404603; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NC\_003550; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NC\_003544; RaMV, *Radish mosaic virus*, NC\_010710; RCMV, *Red clover mottle virus*, NC\_003738; SqMV, *Squash mosaic virus*, NC\_003800.

Comparações das sequências baseadas no RNA2 dos comovírus revelaram que CPSMV e BPMV são mais similares entre si do que entre CPMV e RCMV, da mesma forma que o RCMV e o CPMV são mais similares entre si do que entre BPMV e CPSMV (CHEN & BRUENING, 1992). Estes resultados estão de acordo com a filogenia obtida neste trabalho, que agrupou além do BRMV, o BPMV e o CPSMV. Resultados semelhantes, foram publicados por Han et al. (2002) e Haudenshield & Palukaitis (1998), onde houve um pareamento entre CPMV e RCMV e entre CPSMV e BPMV, em um mesmo clado, deixando em outro clado o SqMV, enquanto o ApMV aparece mais distante.

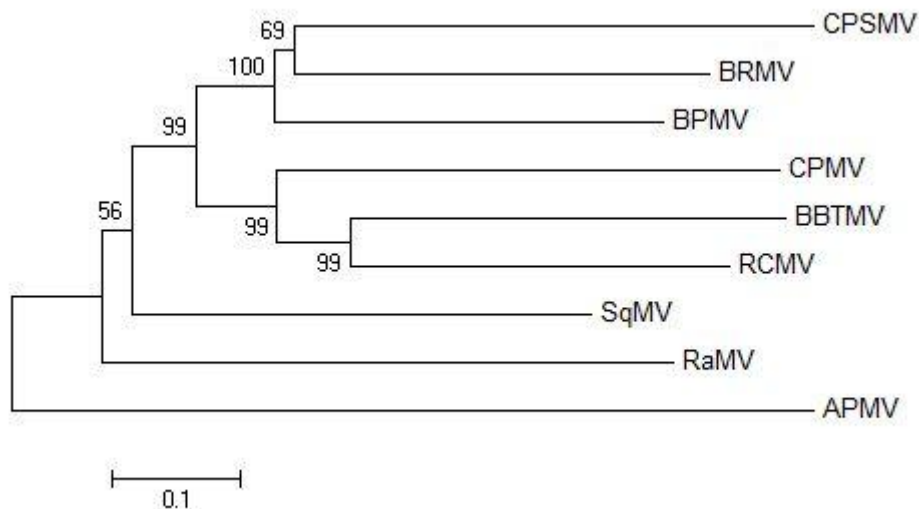
Parece não haver nenhum acordo franco quando comparados os agrupamentos das duas árvores (RNA1 e RNA2). Esta discordância entre as árvores filogenéticas derivadas da Pro-Pol e CPs tem sido observada também entre os vírus do gênero *Nepovirus* (WANG & SANFAÇON, 1999) e *Comovirus* (HAN et al., 2002). Muitas explicações podem ser levadas em consideração a partir desta discrepância. Uma

possibilidade seria a recombinação do material genético que ocorre naturalmente e especialmente em vírus relacionados, neste caso entre os dois RNAs genômicos ou ainda a recombinação dentro de um dos RNAs (WANG & SANFAÇON, 1999).

Árvores filogenéticas baseadas em toda a poliproteína dos dois RNAs do BRMV (Figura 17 e Figura 18), quando comparadas com as árvores baseadas apenas na Pro-Pol para o RNA1 e na CPs para o RNA2, não apresentaram diferenças significativas, formando o mesmo padrão de agrupamento dos clados entre as espécies.



**Figura 17** Árvore filogenética baseada na comparação entre as sequências de aminoácidos da poliproteína do RNA1 de espécies de *Comovirus*. Valores de bootstrap maiores que 50 estão denotados. Abreviações e números de acesso no GenBank: BBTMV, *Broad bean true mosaic virus*, NC\_022004; BPMV, *Bean pod mottle virus*, NC\_003496; BRMV, *Bean rugose mosaic virus*, KP404602; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NC\_003549; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NC\_003545; RaMV, *Radish mosaic virus*, NC\_010709; RCMV, *Red clover mottle virus*, NC\_003741; SqMV, *Squash mosaic virus*, NC\_003799.



**Figura 18** Árvore filogenética baseada na comparação entre as sequências de aminoácidos da poliproteína do RNA2 de espécies de *Comovirus*. Valores de bootstrap maiores que 50 estão denotados. Abreviações e números de acesso no GenBank: APMV, *Andean potato mottle virus*, L16239; BBTMV, *Broad bean true mosaic virus*, NC\_022006; BPMV, *Bean pod mottle virus*, AY744933; BRMV, *Bean rugose mosaic virus*, KP404603; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NC\_003550; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NC\_003544; RaMV, *Radish mosaic virus*, NC\_010710; RCMV, *Red clover mottle virus*, NC\_003738; SqMV, *Squash mosaic virus*, NC\_003800.

## CONCLUSÃO

O isolado viral definido como Paraná do vírus estudado neste trabalho pode ser identificado como um comovírus, e representaria o BRMV, com base nos resultados dos testes de ELISA, RT-PCR e microscopia eletrônica de transmissão. O sequenciamento completo do isolado viral indicou que o BRMV seria uma espécie distinta dentro do gênero *Comovirus*.

Este foi o primeiro trabalho de sequenciamento completo e de caracterização genômica deste vírus e poderá elucidar o posicionamento taxonômico definitivo do BRMV. O vírus, embora apresente sequência muito próxima do *Bean pod mottle virus*, sendo que ambos infectam soja e feijoeiro, pode ser considerado uma espécie distinta e definitiva, com base nos critérios propostos para *Comovirus* pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses).

O BRMV está mais próximo geneticamente do BPMV e do CPSMV, que também infectam leguminosas, do que de outras espécies do gênero *Comovirus*, que infectam solanáceas e crucíferas.

Os resultados de sequenciamento e anotação genômica serão úteis para trabalhos futuros de vetores virais para estudos genéticos, expressão e transformação, além de trabalhos de silenciamento gênico utilizando este patógeno, visto que este é endêmico no Brasil e infecta feijão e soja, culturas de grande importância agrônômica e econômica.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, O.; ALEGRÍA, A.; LASTRA, R. Some biological and physicochemical properties of *Bean rugose mosaic virus*. **Phytopathology** 76(11): 1182-1189. 1986.
- ALMEIDA, A. M. R. Vírus da soja. **Cultivar: Grandes Culturas** 23: 26-32. 2000. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/>. Acesso em: 13 de agosto de 2013.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; HENNING, A. A.; VELOSO, J. F. S.; YORINORI, J. T. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres. p. 642-664. 1997.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Vol. 2. (4 Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo, Agronômica Ceres. p. 569. 2005.
- ALMEIDA, A. M. R.; MEYER, M. C.; ALMEIDA, L. A.; KITAJIMA, E. W.; R. A. GUERZONI, R. A.; NUNES, E. J. Severidade da necrose da haste. **Cultivar: Grandes Culturas** 56: 26-28. 2003.
- ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A.; GOMES, A. C. **Identificação do vírus do mosqueado do feijoeiro (*Bean pod mottle virus*) em soja no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2000. 15 p.
- ANJOS, J. R. N.; COSTA, A. S.; SPERANDIO, C. A.; COSTA, C. L. Mosaico-em-desenho. In: RAVA, C.A. (Ed.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, EMBRAPA/CNPAF. p.285-300. 1994.
- ANJOS, J. R. N.; COSTA, C. L.; KITAJIMA, E. W. Levantamento de viroses em cultura de feijão irrigado na região dos Cerrados. **Fitopatologia Brasileira** 11: 391. 1986. (Resumo).
- BARBOZA, A. A. L. Propriedades biológicas e análise parcial do RNA 1 codificador da replicase de isolados do *Bean rugose mosaic virus*. 2010. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá.
- BIANCHINI, A., A. C. MARINGONI e S. M. T. P. G. CARNEIRO. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Vol. 2. (4 Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo, Agrônômica Ceres. p.333. 2005.
- BIANCHINI, A.; BERGAMIN FILHO, A. Reação induzida em feijoeiro pela interação do vírus do mosaico dourado e do mosaico-em-desenho. pp.21 In: Seminário sobre pragas, doenças e plantas daninhas do feijoeiro. Piracicaba: FEALQ. 1994.

- BIANCHINI, A.; CARNEIRO, S. M. T. P. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. Doenças do feijoeiro e seu controle. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Feijão: tecnologia de produção**. Londrina: IAPAR, 2000. Informe da Pesquisa n. 135, p. 55-75.
- BIANCHINI, A.; HOHMANN, C. L.; ALBERINI, J. L. Distribuição geográfica e orientação técnica para prevenção do vírus do mosaico dourado do feijoeiro no Estado do Paraná. IAPAR. Informe de Pesquisa 42, 3 p., 1981.
- BIANCHINI, A.; KITAJIMA, E. W.; LIN, M. T. Ocorrência do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** 10: 307. 1985.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, v. 2. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, cap. 34. p. 376-399.
- BIANCHINI, A.; MENEZES, J. R.; MARINGONI, A. C. Doenças e seu controle. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Boletim Técnico IAPAR: O feijão no Paraná**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, n. 63, p. 189-216. 1989.
- BOARI, A. J.; FIGUEIRA, A. R. Identificação de estirpes do vírus do mosaico comum do feijoeiro, isoladas de sementes de *Phaseolus vulgaris* produzidas no Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira** 21(4): 410-413. 1996.
- CAMARGO, I. J. B.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Inclusões cristalinas de um vírus isodiamétrico que afeta o feijoeiro. **Ciência e Cultura** 21: 490. 1969.
- CAMARGO, I. J. B.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Microscopia eletrônica do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro *in situ*. **Fitopatologia Brasileira** 1: 207-214. 1976.
- CARETTE, J.; GUHL, K.; WELLINK, J.; VAN KAMMER, A. Coalescence of the sites of *Cowpea mosaic virus* RNA replication into a cytopathic structure. **Journal of Virology** 76: 6235-6243. 2002.
- CARTIN, F. Caracterización de dos nuevas razas del virus del mosaico futozo del frijol. Universidad de Costa Rica, San José. 1973.
- CASTILLO-URQUIZA, G. P.; MAIA, F. G. M.; CARVALHO, M. G.; PINTO, C. M. F.; ZERBINI, F. M. Caracterização de um isolado do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) de Minas Gerais e estimativa de perdas em feijoeiro em infecção simples ou em conjunto com o BCMV. **Fitopatologia Brasileira** 31 (5): 455-461. 2006.
- CHEN, X.; BRUENING, G. Nucleotide sequence and genetic map of *Cowpea severe mosaic virus* RNA2 and comparisons with RNA2 of other comoviruses. **Virology** 187: 682-692. 1992.



CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Indicadores da Agropecuária: Observatório Agrícola**. Ano XXII, nº 11 de novembro de 2014. ISSN: 2317-7535. Brasília, DF. p. 01-92.

COOPER, B.; CAMPBELL, K. B.; MCMAHON, M. B.; LUSTER, D. G. Disruption of *Rpp1*-mediated soybean rust immunity by virus-induced gene silencing. **Plant Signaling & Behavior** 8: e27543-1–e27543-9. 2013.

COSTA, A. F. Efeito das infecções simples e duplas de quatro vírus do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na produção e em algumas características da planta. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília. 1983.

COSTA, A. S. Fitoviroses do feijoeiro no Brasil. In: BULISANI, E. A. **Feijão: fatores de produção e qualidade**. Campinas: Fundação Cargil. p.173-256. 1987.

COSTA, A. S.; GASPAS, J. O.; VEJA, J. Mosaico angular do feijoeiro jalo causado por um vírus do grupo S transmitido por mosca branca. In: Resumos do I Seminário Sobre Pragas e Doenças do Feijoeiro, Campinas. 1980.

COSTA, C. L.; LIN, M. T.; SPERANDIO, C. A. Besouros crisomelídeos vetores do sorotipo IV do *Cowpea severe mosaic virus* isolado de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 6: 523. 1981.

COSTA, C. L.; SANTOS, O. R.; ULHOA, S. C. Disseminação diferencial do vírus do mosaico-do-sul do feijoeiro pela população natural de besouros vetores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 20. Resumos. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira** 12(2): 146. 1987.

CUPERTINO, F. P.; LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, C. L. Occurrence of southern bean mosaic virus in central Brazil. **Plant Disease** 66: 742-743. 1982.

DAUBERT, S. D.; BRUENING, G.; NAJARIAN, R. C. Protein bound to the genome RNAs of *cowpea mosaic virus*. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, 92(1): 45-51. 1978.

DESSENS, J. T.; LOMONOSSOFF, G. P. Mutational analysis of the putative catalytic triad of the *Cowpea mosaic virus* 24K protease. **Virology** 184, 738-746, 1991.

DI, R.; HU, C.; GHABRIAL, S. A. Complete Nucleotide Sequence of *Bean pod mottle virus* RNA1: Sequence comparisons and evolutionary relationships to other comoviruses. **Virus Genes** 18(2): 129-137. 1999.

DUKE, J. A. **Handbook of Legumes of Economic Importance**. Plenum Press, New York, USA. 1992.

EDWARSON, J. R.; CHRISTIE, R. G. Use of virus induced inclusion bodies in classification and diagnosis. **Annual Review of Phytopathology** 16: 31-55. 1978.

FARIA, J. C.; ANJOS, J. R. N.; COSTA, A. F.; SPERÂNCIO, C. A.; COSTA, C. L. Doenças causadas por vírus e seu controle. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE,

- L. F.; ZIMMERMANN, M. J. O. (Eds.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos. p. 731-760. 1996.
- FULTON, J. P.; SCOTT, H. A. Bean rugose mosaic and related viruses and their transmission by beetles. **Fitopatologia Brasileira** 2: 9-16. 1977.
- FURLAN, S. H. Doenças Bióticas e Abióticas do Feijoeiro. **Guia de Identificação e Controle de Doenças do Feijoeiro**. APTO-Instituto Biológico. 2004.
- GALVEZ, G. E.; MORALES, F. J. Virus transmitidos por la mosca blanca, p. 435-464. Citado por Osorno, J. M., J. S. Beaver, F. Ferwerda and P. N. Miklas. 2003. Two genes from *Phaseolus coccineus* L. confer resistance to bean golden yellow mosaic virus. **Ann. Rep. Bean Improv. Coop.** 46: 147-148. 1994.
- GALVEZ, G.; CARDENAS, M.; KITAJIMA, E. W.; DIAZ, A.; NIETO, M. Purification, serology, electron microscopy and properties of Ampollado strain of *Bean rugose mosaic virus*. **Turrialba** 27: 343-350. 1977.
- GAMEZ, R. *Bean rugose mosaic virus*. In: **CMI/AAB Descriptions of plant viruses**, n. 246, 1982.
- GAMEZ, R. Los virus del frijol en Centro América. II. Algunas propiedades y transmisión por crisomélidos del virus del mosaico rugoso del frijol. **Turrialba** 22: 249-257. 1972.
- GARCIA, A.; CALVO, E. S.; KIIHL, R. A.; SOUTO, E. R. Evidence of a susceptible allele inverting the dominance of rust resistance in soybean. **Crop Science** 51: 32-40. 2011.
- GASPAR, J. O.; COSTA, A. S. Efeito do vírus do mosaico angular sobre o metabolismo de carboidratos em feijoeiro Jalo. **Fitopatologia Brasileira** 18(4): 541-544. 1993.
- GASPARIN, M. D. G.; BIANCHINI, A.; SOUTO, E. R.; GASPAR, J. O.; ALMEIDA, A. M. R.; KITAJIMA, E. W. Detecção do *Southern bean mosaic virus* no Paraná, e separação do *Bean rugose mosaic virus* em feijoeiro. **Fitopatologia brasileira** 30(1): 75-78. 2005.
- GHABRIAL, S. A.; HERSHMAN, D. E.; JOHNSON, D. W.; YAN, D. Distribution of *Bean pod mottle virus* in soybeans in Kentucky. **Plant Disease** 74: 132-134. 1990.
- GOLDBACH, R.; SCHILTHUIS, J. G.; REZELMAN, G. Comparison of in vivo and in vitro translation of *Cowpea mosaic virus* RNAs. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 99: 89-94. 1981.
- GOLDBACH, R.; WELLINK, J. Comoviruses: molecular biology and replication. **The Plant Viruses** 5. 1996.

GONG, D.; WANG, J.; LIN, Z.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; YU, N.; XIONG, Z.; LIU, Z. Genomic sequencing and analysis of *Chilli ringspot virus*, a novel potyvirus. **Virus Genes** 43 (3): 439-444. 2011.

GORBALENYA, A.; DONCHENKO, A. P.; BLINOV, V. M.; KOONIN, E. V. Cysteine proteases of positive-strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases: A distinct protein superfamily with a common structural fold. **FEBS Letters** 243: 103-114. 1989.

GORBALENYA, A. E.; KOONIN, E. V. Superfamily of UvrA-related NTP-binding proteins. Implications for rational classification of recombination/repair systems. **Journal of Molecular Biology** 213(4): 583-91. 1990.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology** 131: 872-877. 2003.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. APS Press. 1991.

HAN, S. S.; YOSHIDA, K.; KARASEV, A. V.; IWANAMI, T. Nucleotide sequence of a Japanese isolate of *Squash mosaic virus*. **Archives of Virology** 147: 437-443. 2002.

HAUDENSHIELD, J. S.; PALUKAITIS, P. Diversity among isolates of *Squash mosaic virus*. **Journal of General Virology** 79: 2331-2341. 1998.

HOFFMANN, L. L.; NORA, T. D.; OLIVEIRA, M. A. R.; ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da soja: necrose da haste**. Coodetec, Disponível em <http://www.coodetec.com.br/artigos.htm>. Acesso em 27 de Outubro de 2013.

HOLNESS, C. L.; LOMONOSSOFF, G. P.; EVANS, D.; MAULE, A. J. Identification of the initiation codons for translation of *Cowpea mosaic virus* middle component RNA using site-directed mutagenesis of an infectious cDNA clone. **Virology** 172: 311-320. 1989.

HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego. 2002.

JEONG, R. D.; HWANG, S. H.; KANG, S. H.; CHOI, H. S.; PARRK, J. W.; KIM, K. H. Virus induced gene silencing as tool for functional genomics in a *Glycine max*. **Plant Pathology Journal** 21: 158-163. 2005.

KAMER, G.; ARGOS, P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. **Nucleic Acids Research** 12: 7269-7282. 1984.

KHANDEKAR, S.; HE, J.; LEISNER, S. Complete nucleotide sequence of the Toledo isolate of Turnip ringspot virus. **Archives of Virology** 154: 1917-1922. 2009.

KITAJIMA, E. W.; LIN, M. T.; COSTA, C. L.; BATISTA, M. F. Ocorrência do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira** 5: 408. 1980.

- KOMATSU, K.; HASHIMOTO, M.; MAEJIMA, K.; OZEKI, J.; KAGIWADA, S.; TAKAHASHI, S.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. Genome sequence of a Japanese isolate of *Radish mosaic virus*: the first complete nucleotide sequence of a crucifer-infecting *Comovirus*. **Archives of Virology** 152: 1501–1506. 2007.
- KOONIN, E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. **The Journal of General Virology** 72: 2197–2206. 1991.
- KOONIN, E. V.; CHOI, G. H.; NUSS, D. L.; SHAPIRA, R.; CARRINGTON, J. C. Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88: 10647-10651. 1991.
- KOONIN, E. V.; CHUMAKOV, K. M.; GORBALENYA, A. E. Tentative identification of the RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA viruses. **FEBS Letters** 252: 42-46. 1989.
- KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 28: 375–430. 1993.
- LE GALL, O.; IWANAMI, T.; KARASEV, A. V.; JONES, T.; LEHTO, K.; SANFAÇON, H.; WELLINK, J.; WETZEL, T.; YOSHIKAWA, N. Family *Comoviridae*. In: Fauquet CM (ed) **The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, San Diego, CA, 807-18. 2005.
- LIN, M. T.; GÁMEZ, R. G.; KITAJIMA, E. W. Bean "mosaico-em-desenho" virus is a member of the *Bean rugose mosaic virus* serogroup. **Fitopatologia Brasileira** 6: 293-298. 1981.
- LOMONOSSOFF, G.; SHANKS, M. The nucleotide sequence of *Cowpea mosaic virus* B RNA. **The EMBO Journal** 2(12): 2253-2258. 1983.
- LOMONOSSOFF, G.; SHANKS, M.; MATTHES, H.; SINGH, M.; GAIT, M. The location of the first AUG codons in *Cowpea mosaic virus* RNAs. **Nucleic Acids Research** 10: 4861-4872. 1982.
- MACFARLANE, S. A.; SHANKS, M.; DAVIES, J. W.; ZLOTNICK, A.; LOMONOSSOFF, G. P. Analysis of the nucleotide sequence of *Bean pod mottle virus* middle component RNA. **Virology** 183 (1): 405-409. 1991.
- MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J. B.; CHERUKURI, P. F.; DEWEESE-SCOTT, C.; GEER, L. Y.; GWADZ, M.; HE, S.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C. J.; LIEBERT, C. A.; LIU C.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; SHOEMAKER, B. A.; SIMONYAN, V.; SONG, J. S.; THIESSEN, P. A.; YAMASHITA, R. A.; YIN, J. J.; ZHANG, D.; BRYANT, S. H. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. **Nucleic Acids Research** 1(33): 192-196. 2005

MARTINS, T. R.; ALMEIDA, A. M. R.; ALMEIDA, L. A.; NEPOMUCENO, A.; CHAGAS, C. M.; TOLEDO, J. F. F. Sinergismo observado em plantas de soja infectadas pelos vírus do mosaico comum da soja e do mosaico-em-desenho do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 19: 430-436. 1994.

MATTHEWS, R. E. F. **Fundamentals of Plant Virology**. Academic Press, Inc. 403 p. 1992.

MAYO, M. A.; FRITSCH, C. A possible consensus sequence for VPg of viruses in the family *Comoviridae*. **FEBS Letters** 354: 129-130. 1994.

MOREIRA, A. E.; GASPAR, J. O. Propriedades moleculares de um isolado brasileiro do southern bean mosaic virus. **Fitopatologia Brasileira** 27: 292-297. 2002.

MOREIRA, A., KITAJIMA, E., REZENDE, J. Identification and partial characterization of a *Carica papaya* -infecting isolate of *Alfafa mosaic virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology** 76 (2): 172-175. 2010.

MUÑOZ, J. O.; KITAJIMA, E. W. Estudo comparativo da citopatologia induzida por alguns vírus do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em infecções simples. **Fitopatologia Brasileira** 15: 276-284. 1990.

NAGAMATSU, A.; MATSUTA, C.; SENDA, M.; MATSUURA, H.; KASAI, A.; HONG, J. S.; KITAMURA, K.; ABE, J.; KANAZAWA, A. Functional analysis of soybean genes involved in flavanoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. **Plant Biotechnology Journal** 5: 778-790. 2007.

PELHAM, H.R.B. Synthesis and proteolytic processing of *Cowpea mosaic virus* proteins in reticulocyte lysates. **Virology** 96: 463-477. 1979.

PETRZIK, K.; HOLÁ, M.; SPAK, J. Complete nucleotide sequence of *Radish mosaic virus* RNA polymerase gene and phylogenetic relationships in the genus *Comovirus*. **Acta Virologica** 49: 271-275. 2005.

POOLPOL, P.; INOUYE, T. Ultrastructure of plant cells doubly infected with potyviruses and other unrelated viruses. **Bulletin of the University of Osaka Prefecture Series** 38: 13-23. 1986.

POUWELS, J.; CARETTE, J. E.; VAN LENT, J.; WELLINK, J. *Cowpea mosaic virus*: effects on host cell processes. **Molecular Plant Pathology** 3: 411-418. 2002.

RAJAKARUNA, P.; KHANDEKAR, S.; MEULIA, T.; LEISNER, S. M. Identification and host relations of Turnip ringspot vírus, a novel Comovirus from Ohio. **Plant Disease** 91: 1212-1220. 2007.

RITZENTHALER, C.; VIRY, M.; PINCK, M.; MARGIS, R.; FUCHS, M.; PINCK, L. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Grapevine fanleaf nepovirus RNA1. **Journal of General Virology** 72: 2357-2365. 1991.

SANFAÇON, H.; IWANAMI, T.; KARASEV, A.V.; VAN DER VLUGT, R.; WELLINK, J.; WETZEL, T.; YOSHIKAWA, N. Family Secoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carsyens EB, Lefkowitz EJ (eds) **Virus taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, London, pp 881–899. 2011.

SANFAÇON, H.; WELLINK, J.; LE GALL, O.; KARASEV, A.; VAN DER VLUGT, R.; WETZEL, T. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae, and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. **Archives of Virology** 154: 899-907. 2009.

SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de Frijol**. CIAT – Centro Internacional de Agroicultura Tropical. Cali, Colômbia. 56 p. 1987.

SOUTO, E. R.; ALMEIDA, A. M. R.; BIANCHINI, A.; SARTORI, F.; CALVO, E. Análise molecular de segmento do RNA2 de comovirus isolados de soja no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** 27(5): 525-527. 2002.

SPERANDIO, C. A. Caracterização do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, Brasília. 1982.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30: 2725-2729. 2013.

VANCE, V. B.; BERGER, P. H.; CARRINGTON, J. C.; HUNT, A. G.; SHI, X. M. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. **Virology** 206: 583-590, 1995.

VIEIRA, C.; PAULA, J. T. J. D.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa. Imprensa Universitária. 1998.

WANG, A.; SANFACON, H. Diversity in the coding regions for the coat protein, VPg, protease, and putative RNA-dependent RNA polymerase among Tomato ringspot nepovirus isolates. **Canadian Journal of Plant Pathology** 22: 145–149. 1999.

WANG, Y.; XIAO, M.; CHEN, J.; ZHANG, W.; LUO, J.; BAO, K.; NIE, M.; CHEN, J.; LI, B. Mutational analysis of the GDD sequence *motif* of classical swine fever virus RNA-dependent RNA polymerases. **Virus Genes** 34: 63–65. 2007.

WELLINK, J. Comovirus Isolation and RNA Extraction. In: FOSTER, G. D.; TAYLOR, S. C. (Eds.). **Methods in Molecular Biology**, volume 81: Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance. Human Press, Inc. 1998. 571 p.

WEZENBEEK, P.; VERVER, J.; HARMSSEN, J.; VOS, P.; KAMMEN, A. Primary structure and gene organization of the middle-component RNA of *Cowpea mosaic virus*. **The EMBO Journal** 2(6): 941-946. 1983.

YANG, X.; CHARLEBOIS, P.; GNERRE, S.; COOLE, M. G.; LENNON, N. J.; LEVIN, J. Z.; QU, J.; RYAN, E. M.; ZODY, M. C.; HENN, M. R. *De novo* assembly of highly diverse viral populations. **BMC Genomics** 13:4 5. 2012.

YOGOYAMA, L. P. **Cultura do feijoeiro no Brasil: características da produção**. Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão. 2000.

ZHANG, C.; BRADSHAW, J. D.; WHITHAM, S. A.; HILL, J. A. The development of an efficient multipurpose *Bean pod mottle virus* viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. **Plant Physiology** 153: 52-65, 2010.

ZHANG, C.; GHABRIAL, S. A. development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. **Virology** 344: 401-411. 2006.

ZHANG, C.; GU, H.; GHABRIAL, S. A. Molecular characterization of naturally occurring RNA1 recombinants of the *Comovirus* Bean pod mottle virus. **Phytopathology** 97: 1255-1262. 2007.