

ANTONIO AUGUSTO LAZARINI BARBOZA

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E ANÁLISE PARCIAL DO RNA1
CODIFICADOR DA REPLICASE DE ISOLADOS DO
*Bean rugose mosaic virus***

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

ANTONIO AUGUSTO LAZARINI BARBOZA

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E ANÁLISE PARCIAL DO RNA1
CODIFICADOR DA REPLICASE DE ISOLADOS DO
*Bean rugose mosaic virus***

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

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B239p

Barboza, Antonio Augusto Lazarini, 1981.

Propriedades biológicas e análise parcial do RNA1 codificador da replicase de isolados do *Bean rugose mosaic virus* / Antonio Augusto Lazarini Barboza. -- Maringá, 2010.

xv, 65 f. : figs. color., tabs.

Orientador : Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2010.

1. *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) - RNA1. 2. RNA polimerase. 3. Feijoeiro - Infecção por *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). 4. Filogenia. 5. Secoviridae. 6. *Comovirus*. I. Souto, Eliezer Rodrigues de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 632.8

ANTONIO AUGUSTO LAZARNI BARBOZA

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E ANÁLISE PARCIAL DO RNA1
CODIFICADOR DA REPLICASE DE ISOLADOS DO
*Bean rugose mosaic virus***

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

Maringá, 25 de Fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Alberto de B. Andrade

Dra. Claudete A. Mangolin

Dr. Álvaro M. R. Almeida

Dr. Anésio Bianchini

Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto
(Orientador)

*O tempo passou, mas nunca vou me esquecer da frase:
“Ai meu Deus, acho que ele não vai fazer faculdade” risos...
Em certos momentos da vida ouvimos algumas dicas que a
princípio nos parecem “chatas”, depois de algum tempo o
mesmo conselho já não soa tão mal! E mais adiante um pouco,
conseguimos traduzir tais dicas, em preocupação, amor,
carinho, e passamos a ver e a concordar com o que “ELA”
sempre falava...*

*A você, minha Mãe, que sempre acreditou em
mim e por sempre estar ao meu lado, eu dedico esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo.

Ao Curso de Doutorado em Agronomia - UEM, pelo crescimento científico.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto, pela amizade, ensinamento, apoio, muita paciência e broncas, muito importantes durante todo o meu aprendizado.

A todos os professores da Pós Graduação em Agronomia, da UEM, pelo ensinamento transmitido.

Ao Dr. Álvaro Manuel Rodrigues Almeida, pesquisador da EMBRAPA – Soja, pela amizade, orientação, dedicação e sem dúvida pelo exemplo como profissional e homem, transmitido durante esta etapa da minha vida.

Ao Dr. Anésio Bianchini, pesquisador do IAPAR, pela orientação e apoio durante este trabalho.

À Érika, secretária do Programa de Pós Graduação em Agronomia da UEM, pela amizade, paciência e grande atenção para comigo e demais estudantes.

À Embrapa-Soja, por toda a estrutura oferecida, sem dúvida, de extrema importância para a conclusão deste estudo.

Aos Amigos e Técnicos do Laboratório de Virologia da Embrapa-Soja, Luis Carlos BENATO e Nilson VALENTIM pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade conquistada, pelo exemplo de trabalho em equipe e principalmente pelo exemplo de pessoas que são.

A Silvana R. Marin, pela amizade, ensinamentos e estimada ajuda durante os trabalhos com biologia molecular desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa-Soja.

À minha grande amiga, a senhora Vera Lucia, que com o seu carinho e atenção esteve sempre pronta para escutar minhas preocupações e também minhas alegrias, muito obrigado Verinha!

Aos funcionários da Embrapa Vieira, Everaldo, Diego, Cesar, Márcia, Alan, Tia Alda, Ângelo, Lucas e tantos outros pela amizade e apoio.

Ao Dr. Rodrigo M. Pereira, pela amizade, paciência e principalmente pela estimada ajuda com os trabalhos de Bioinformática.

À minha supermãe, Edna, por acreditar em mim, por me dar forças, pelo incentivo, amor, preocupação e por sempre se fazer presente e disposta a me ajudar em qualquer situação. Obrigado por tudo, obrigado principalmente por ser a minha mãe!

Ao meu pai Rui e a minha querida Avó, “Vó Cida”, meu verdadeiro “Anjo da Guarda”, pelo seu carinho em todos os momentos.

Ao meu melhor amigo e graças a Deus meu irmão, Luis Fernando, pela amizade, carinho, apoio, exemplo de determinação e confiança para enfrentar todas as dificuldades.

À Cristiane Moreno pelo seu carinho, atenção, paciência, compreensão e sua presença na minha vida.

Aos amigos Davizinho, Fernando, Inez, João Paulo e a Amandinha, pela amizade fraterna de todas as horas.

Ao grande amigo Ricardo R. Oliveira, “Mineirinho”, por sua amizade, parceria e ajuda desde os tempos do mestrado.

Ao Prof. João Vida e a Marilda amigos desde o início da minha pós-graduação, o meu muito obrigado pela amizade, conselhos e companheirismo.

Aos amigos conquistados ao longo deste trabalho, Breno, Rodrigo Bhremer, Junior, Mauro, Marcelo Picoli, Patrícia, Jaqueline, Taisse, Iris Ziober, Gustavo Mendes, Larissa Giroto, Maria Cecília, Gloria, Micheli, Daiana, João Vitor, Andre, Mauricio, Victor, Danielli, Mariana, Tatiani, Daysa, Tansse e a todos aqueles que estiveram presentes seja trabalhando, seja nos momentos

de descontração, discutindo, e, sem dúvida, somando para o meu crescimento pessoal e profissional.

BIOGRAFIA

ANTONIO AUGUSTO LAZARINI BARBOZA, filho de Rui Augusto Barboza e Edna Maria Lazarini Barboza, nascido em Londrina, Estado do Paraná, aos 04 dias do mês de outubro de 1981.

Em 2003, graduou-se no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, pelo Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL), na cidade de Londrina, Estado do Paraná.

Em fevereiro 2006, concluiu o curso de Mestrado em Agronomia na área de concentração de Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), na cidade de Maringá, Estado do Paraná.

Em março de 2006, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia na área de concentração de Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 A Cultura do Feijoeiro	03
2.2 Principais Viroses do Feijoeiro e Soja	04
2.3 Subfamília Comovirinae e Gênero <i>Comovirus</i>	12
2.4 <i>Bean rugose mosaic virus</i>	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Purificação e Manutenção dos Isolados Virais	21
3.2 Inoculações Mecânicas	22
3.3 Concentrações Relativas dos Isolados Virais pelo Teste ELISA Indireto	22
3.4 Purificações dos Isolados de <i>Bean rugose mosaic virus</i>	23
3.5 Caracterização Molecular dos Isolados	24
3.5.1 Extração do RNA total	24
3.5.2 Reações de Transcrição Reversa (RT-PCR)	26
3.5.3 Reações de Semi-Nested RT-PCR	28
3.5.4 Purificação do material amplificado nas reações de semi-nested RT-PCR	29
3.6 Clonagens e Sequenciamento	30
3.6.1 Preparo de células eletro-competente de <i>Escherichia coli</i>	30
3.6.2 Transformação e eletroporação	31
3.6.3 Preparação de plasmídeos em microplacas (MINIPREP)	32

3.6.4 PCR de sequenciamento.....	33
3.6.5 Preparo das amostras e sequenciamento dos fragmentos obtidos	34
3.6.6 Análise das sequências	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Concentração Relativa de Vírus Determinada por ELISA Indireto	36
4.2 Purificações dos Isolados de <i>Bean rugose mosaic virus</i>	37
4.3 Caracterização Molecular dos Isolados de BRMV	40
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Sequências de <i>primers</i> degenerados sugerida por Maliogka <i>et al.</i> (2004) usado na identificação de isolados virais dos gêneros <i>Nepovirus</i> , <i>Comovirus</i> e <i>Fabavirus</i> (Secoviridae)	28
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Organização do genoma de um comovírus, representada através do genoma de um isolado japonês de *Radish mosaic virus*, segundo Komatsu *et al.* (2007) 15
- Figura 02 - Sintomas de mosaico intenso e rugosidade em folhas de feijão cv. Rio Tibagi induzidos pelos isolados de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) de feijoeiro (A) e de soja (B). 35
- Figura 03 - Sintomas em plantas de *Chenopodium amaranticolor*, mostrando lesões locais cloróticas e necróticas, induzidas pela infecção do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV)..... 36
- Figura 04 - Concentração relativa de vírus determinada por Elisa indireto em plantas de feijão cv. Rio Tibagi, inoculadas com os isolados de *Bean rugose mosaic virus* de soja, de feijoeiro e infecção mista (mistura de ambos os isolados) 37
- Figura 05 - Resultados das leituras obtidas em fracionador ISCO, absorvância (254 nm), de preparações purificadas em gradiente de sacarose a 20%. Os picos de leitura em cada gráfico foram correlacionados aos componentes virais de *Comovirus* (T = componente superior, M = componente médio, B = componente inferior). 1 – *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) isolado de soja, 2 - BRMV isolado de feijoeiro e 3 - infecção mista 39
- Figura 06 - Resultados de extrações de RNA Total, separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio, utilizando a combinação do kit RNeasy (Qiagen®) com o reagente Trizol®. 1 e 2 - materiais infectados com o isolado de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) de feijoeiro; 3 e 4 - materiais infectados com o isolado de BRMV de soja40
- Figura 07 - Resultado de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado

com brometo de etídio, dos produtos da amplificação por semi-nested RT-PCR, utilizando *primers* descritos por Maliogka *et al.* (2004). Amplificação da região conservada do RNA1 de vírus da família Secoviridae. (M) - marcador molecular 100pb; 1 e 2 - BRMV isolado de feijoeiro; 3 e 4 - controle negativo (planta sadia); 5 e 6 - BRMV isolado de soja 41

Figura 08 - Resultados de eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação por semi-nested RT-PCR utilizando *primers* descritos por Maliogka *et al.* (2004), em diferentes combinações. (M) - Marcador molecular 100pb; 1- isolado de feijoeiro com os *primers* ComF1 + ComNeR4; 2 - isolado de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) de feijoeiro com os *primers* ComF1 + ComNeR5; 3 - isolado de BRMV de feijoeiro com os *primers* ComNeF3 + ComR2; 4 - isolado de BRMV de soja com os *primers* ComF1 + ComNeR4; 5 - isolado de BRMV de soja com os *primers* ComF1 + ComNeR5; 6 - isolado de BRMV de soja com os *primers* ComNeF3 + ComR2 43

Figura 09 - Alinhamento da sequência correspondente a RdRp de BRMV, com a sequência do RNA1 do *Radish mosaic virus*. A análise comparativa revelou similaridade de 71% entre os vírus. Alinhamento realizado em 11 de janeiro de 201045

Figura 10 - Alinhamento da sequência correspondente a RdRp de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV), com a sequência do RNA1 do *Bean pod mottle*. A análise comparativa revelou similaridade de 69% entre os vírus. Alinhamento realizado em 11 de janeiro de 2010 46

Figura 11 - Resultado do sequenciamento dos produtos de semi-nested RT-PCR. Sequência de 756 nucleotídeos e a respectiva tradução em aminoácidos da região interna conservada codificadora RdRp do RNA1 do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). Em destaque as sequências de aminoácidos conservada entre os comovírus, (S/W)EG(Y/F)P; GK e (T/Y)YGDDN(V/L), utilizadas na construção dos *primers* descritos por Maliogka *et al.* (2004) 47

Figura 12 - Resultado do alinhamento da sequência traduzida do

fragmento de 756pb do gene codificador da RNA polimerase do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) com a sequência do domínio conservado da RdRp (Cdd/cd01699), indica a alta similaridade entre as sequências. Em destaque o *motifs* VI GDD, região conservada em todos os vírus de RNA senso positivo (KONNIN, 1991). 48

Figura 13 - Resultado do alinhamento da região conservada da RNA polimerase do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) (RdRp) com as sequências completas do RNA1 dos Secoviridae: *Andean potato mottle virus* - APMoV (gi/586232/); *Squash mosaic virus* - SqMV (gi/81963673/); *Radish mosaic virus* – RaMV (gi/213972515/); *Turnip ringspot virus* - TuRSV (gi|260876006|); *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (gi/549316/); *Bean pod mottle virus* - BPMV (gi/81951160/); *Cowpea mosaic virus* - CPMV (gi/138362/); *Red clover mottle virus* - RCMV (gi/549317/); *Broad bean wilt virus 1* - BBWV-1 (gi/38044071/); *Broad bean wilt virus* - BBWV-ME (gi/81980609/); *Broad bean wilt virus 2* - BBWV-2 (gi/81980609/); *Patchouli mild mosaic virus* - PatMMV (gi/81997058/); *Blackcurrant reversion-associated virus* - BRAV (gi/50400782/); *Peach rosette mosaic virus* - PRMV (gi/81920792/); *Grapevine fanleaf virus* - GFLV (gi/130392/); *Tobacco ringspot virus* - TRSV (gi/50401020/); *Cycas necrotic stunt virus* - CNSV (gi/50400776/); *Tomato black ring virus* - TBRV (gi/51316452/); *Grapevine chrome mosaic virus* – GCMV (gi/130391/) 49

Figura 14 - Resultado de múltiplos alinhamentos de sequências de aminoácidos do domínio conservado da RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) de espécies dos gêneros *Comovirus*, *Nepovirus* e *Fabavirus*, utilizando programa ClustalW2: (A a F) *Bean rugose mosaic virus* - BRMV gi|284807373|; *Andean potato mottle virus* - APMoV (gi/586232/); *Squash mosaic virus* - SqMV (gi/81963673/); *Radish mosaic virus* - RaMV (gi/213972515/); *Turnip ringspot virus* - TuRSV (gi|260876006|); *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (gi/549316/); *Bean pod mottle virus* - BPMV (gi/81951160/); *Cowpea mosaic virus* - CPMV (gi/138362/); *Red clover mottle virus* - RCMV

(gi/549317/); *Broad bean wilt virus 1* - BBWV-1 (gi/38044071/); *Broad bean wilt virus* - BBWV-ME (gi/81980609/); *Broad bean wilt virus 2* - BBWV-2 (gi/81980609/); *Patchouli mild mosaic virus* - PatMMV (gi/81997058/); *Blackcurrant reversion-associated virus* - BRAV (gi/50400782/); *Peach rosette mosaic virus* - PRMV (gi/81920792/); *Grapevine fanleaf virus* - GFLV (gi/130392/); *Tobacco ringspot virus* - TRSV (gi/50401020/); *Cycas necrotic stunt virus* - CNSV (gi/50400776/); *Tomato black ring virus* - TBRV (gi/51316452/); *Grapevine chrome mosaic virus* – GCMV (gi/130391/) 54

RESUMO

BARBOZA, Antonio Augusto Lazarini. **PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E ANÁLISE PARCIAL DO RNA1 CODIFICADOR DA REPLICASE DE ISOLADOS DO *Bean rugose mosaic virus***. Universidade Estadual de Maringá, Fevereiro de 2010. Professor Orientador: Eliezer Rodrigues de Souto.

O *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) pertence ao gênero *Comovirus*, possui genoma constituído de duas moléculas de RNA fitas simples, senso positivo, denominadas de RNA1 e RNA2 e apresenta gama de hospedeiras restrita, nas quais induz sintomas sistêmicos de mosaico, bolhosidade e deformação foliar no feijoeiro. Plantas de soja e de feijão apresentando sintomas característicos de infecção por BRMV foram coletadas no Paraná. Os isolados foram mantidos em casa de vegetação em plantas de feijoeiro cv. Rio Tibagi. Os isolados foram purificados, permitindo a constatação da presença de três picos de leitura de absorvância que puderam ser correlacionados aos componentes virais de *Comovirus*. Ensaios de Elisa indireto apontaram para diferenças na concentração relativa individual de cada isolado, a qual se manteve inalterada mesmo nas infecções mistas. O RNA dos isolados foi extraído e um protocolo de semi-nested RT-PCR foi utilizado na amplificação de um fragmento de 700pb do RNA1, o qual foi clonado e sequenciado. Comparações com outras sequências do Genbank indicaram uma identidade de 79% dessa sequência com o RNA1 do *Bean pod mottle virus*. Através da identificação da tríade de aminoácidos GDD, que é conservada nas replicases dos vírus de RNA senso positivo, foi identificada a região conservada da RNA polimerase, codificada pelo RNA1 do BRMV. A análise filogenética permitiu a classificação do BRMV como membro da família Secoviridae, agrupando-o próximo ao BPMV, bem como de outros comovírus de leguminosas. A sequência da região 3' do RNA1 do BRMV encontra-se depositada no GenBank sob o código de acesso *GU205154* ou *gi|284807373|*.

Palavras-chave: Secoviridae, *Comovirus*, filogenia, RNA polimerase, feijoeiro, BRMV.

ABSTRACT

BARBOZA, Antonio Augusto Lazarini. **BIOLOGICAL PROPERTIES AND PARTIAL ANALYSIS OF ENCODER RNA1 replicase OF ISOLATED *Bean rugose mosaic virus***. Universidade Estadual de Maringá, 2010 February. Advisor Professor: Eliezer Rodrigues de Souto.

Bean rugose mosaic (BRMV) is a member of the *Comovirus* genus. The virus genome consists of two molecules of single strand RNA, positive sense, called RNA1 and RNA2. BRMV has a restricted host range, causing systemic symptoms such as blistering and leaf deformation on beans. Soybean and bean plants showing characteristic symptoms of BRMV infection were collected in Paraná state. The isolates were maintained in 'Rio Tibagi' bean plants in greenhouse conditions. The virus purified preparation gave three peaks of absorbance readings that could be correlated to the *comoviruses* particle components. Indirect ELISA tests pointed to replication differential rates for each virus isolate that remained constant even after virus mixed infections. The RNA of both isolates was extracted and a protocol for semi-nested RT-PCR was used to amplify a RNA1 fragment of 700bp, that was cloned and sequenced. Comparisons of the nucleotide sequence with others from the Genbank showed 79% identity with RNA1 of *Bean pod mottle virus*. The identification of the RNA polymerase coded by BRMV RNA1 was confirmed through the GDD amino acid triad that is conserved in the RNA replicase of all positive sense viruses. The phylogenetic analysis allowed the classification of BRMV as a member of the Secoviridae family. BRMV could be situated next to BPMV, among other comoviruses infecting leguminosae plants. The sequence of the 3' RNA1 region of BRMV is deposited in the GenBank under the accession number *GU205154* or *gi|284807373*.

Keywords: Secoviridae, *Comovirus*, phylogenetic, RNA polymerasem, bean, BRMV

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças causadas por vírus foram identificadas em lavouras de feijão no país. Dentre estes vírus, os isométricos constituem um grupo heterogêneo, que engloba representantes dos chamados *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Sobemovirus* entre outros (COSTA, 1987). Algumas destas viroses encontram-se amplamente disseminadas no país e são de ocorrência generalizada, enquanto outras aparentemente são restritas a determinadas áreas (CAMARGO *et al.*, 1969 e 1976; KITAJIMA *et al.*, 1980).

O vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus* - BGMV) é responsável pelas maiores perdas na cultura do feijão. A ocorrência de infecções mistas entre diferentes *Geminivirus*, e destes com vírus de outros gêneros, como o *Comovirus*, é muito comum, agravando os sintomas da doença.

Nas regiões produtoras de feijão no Estado do Paraná há ocorrências do vírus do “mosaico-em-desenho” do feijoeiro (*Bean rugose mosaic virus* - BRMV), principalmente em infecções mistas com o BGMV, o que proporciona maior severidade de sintomas causando perdas na produção (BIANCHINI *et al.*, 1985; MARTINS *et al.*, 1994).

O BRMV é um *Comovirus*, da família Secoviridae (SANFAÇON *et al.*, 2009), descrito pela primeira vez infectando feijão na Costa Rica (GÁMEZ, 1972 e 1982). Posteriormente, observou-se a doença 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).

Este vírus caracteriza-se por apresentar genoma composto por duas moléculas de RNA de fita simples, sentido positivo, encapsuladas separadamente em partículas icosaédricas com diâmetro de 28 a 30 nm. Os dois RNAs possuem uma proteína viral (VPg) ligada covalentemente à suas

extremidades 5', e uma cauda poli-A nas extremidades 3', sendo que o RNA1 codifica proteínas envolvidas na replicação, o RNA2 codifica proteínas estruturais e proteínas necessárias para o movimento célula-a-célula, ambos RNAs necessários para a infecção sistêmica da planta hospedeira (CHEN e BRUENING, 1992b; POUWELS *et al.*, 2002).

Vírus de RNA senso positivo são muito estudados por apresentarem características genéticas comuns entre si. Além de possuírem a proteína VPg, que está envolvida na replicação, encontram-se também a helicase, protease e a RdRp (RNA dependente de RNA polimerase), sendo a última de extrema importância durante a replicação viral e nas análises filogenéticas de vírus que codificam a RdRp, pois apresenta regiões conservadas (RUECKERT e WIMMER, 1984; KOONIN e DOLJA, 1993; BUCK, 1996).

O desenvolvimento de estratégias eficazes para o controle de vírus que infectam plantas depende da disponibilidade de métodos seguros para a detecção e identificação viral. No caso do complexo viral que infecta o feijoeiro, é imprescindível a identificação e caracterização destes vírus, possibilitando assim, maiores esclarecimentos sobre os vírus relacionados aos sintomas de mosaico.

Este trabalho teve como objetivos padronizar metodologias para estudo das propriedades biológicas e moleculares dos isolados de *Bean rugose mosaic virus* obtidos de cultivo de feijão e soja do estado do Paraná, utilizar as informações obtidas desta padronização para complementar as informações já existentes e, disponibilizar sequências de regiões genômicas para estudos taxonômicos destes vírus.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura do Feijoeiro

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é, sem dúvida, o alimento mais popular no Brasil. Esta leguminosa faz parte da dieta alimentar e nutricional dos brasileiros, por ser um grão rico em proteínas, ferro e carboidratos. Além do feijão-comum, existem ainda outras espécies cultivadas no país, como por exemplo, o feijão-azuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi e Ohashi), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.); feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e o feijão caupi ou feijão-de-corda (*Viana unguiculata* (L.) Walp.), que no nordeste do país constitui a alimentação básica da população (VIEIRA *et al.*, 2006; PAULA JUNIOR e VENZON, 2007).

O Brasil é o maior produtor de feijão do mundo, assim como também o maior consumidor, apresentando um consumo estimado de aproximadamente 16 kg/ano por pessoa. Mesmo assim, este consumo ainda é menor que a média estimada na década de 1970, quando o consumo era de aproximadamente 25 kg/ano (VIEIRA *et al.*, 2006; PAULA JUNIOR e VENZON, 2007).

A cultura do feijão ocupa lugar de destaque na agricultura brasileira, tanto em área plantada como em volume de produção, além de ser importante na ocupação de mão-de-obra (LOLLATO *et al.*, 2001). A época de plantio, o ataque de pragas e doenças, e o preço não atrativo, diminuíram o interesse de grandes agricultores por esta cultura, sendo hoje muito cultivado por pequenos produtores. As pesquisas voltadas ao feijoeiro no país datam da década de 1950, período em que ocorreu um aumento significativo da população brasileira, o que não aconteceu com a produção de feijão, gerando assim uma escassez temporária dessa leguminosa no mercado. Fato que chamou a atenção de pesquisadores para essa cultura, levando-os a estudos que

procuraram desenvolver variedades de feijoeiro mais produtivas (VIEIRA *et al.*, 2006; PAULA JUNIOR e VENZON, 2007).

Reconhecido como cultura de subsistência em pequenas propriedades, o feijoeiro é cultivado em todo o país. O sistema de comercialização é o mais variado possível, predominando um pequeno grupo de atacadistas que concentra a distribuição da produção, gerando especulações, principalmente quando ocorrem problemas na produção. Dependendo da região, o plantio de feijão é realizado ao longo do ano em três épocas, deste modo em qualquer época do ano, sempre existe a produção de feijão em algum ponto do país (ROSSI e MANOLESCU, 2004).

Os estados do Paraná, Minas Gerais, Rondônia, Ceará, Pernambuco, São Paulo e Goiás são destaques na produção de feijão no país. O feijão cultivado de primeira safra é plantado entre os meses de agosto e outubro no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e na Região de Irecê na Bahia. O de segunda safra é cultivado de abril a junho pelos produtores do Sul-Sudeste; porém nesse mesmo período se dá a primeira e única safra para os produtores do Norte, Centro-Oeste e Nordeste. A terceira e última safra é conhecida como safra de inverno, realizada entre os meses de junho/julho nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Bahia na região de Barreiras, sempre sob sistema irrigado por pivô-central, atingindo alta produtividade, e abastecendo o mercado entre o final da comercialização da segunda safra e o início da primeira (ROSSI e MANOLESCU, 2004).

2.2 Principais Viroses do Feijoeiro e Soja

No Brasil, foram assinaladas diversas doenças causadas por vírus. Entre estas, algumas se encontram amplamente disseminadas no país, apresentando ocorrência generalizada. Entretanto, existem aquelas que aparentemente são restritas a determinadas áreas (CAMARGO *et al.*, 1969; 1976; KITAJIMA *et al.*, 1980; COSTA, 1987).

Uma virose bastante comum nessa cultura é causada pelo vírus do mosaico comum do feijoeiro (*Bean common mosaic virus* - BCMV) membro do gênero *Potyvirus*, esta virose causa perdas de 35 a 98% na produção, dependendo do estágio da planta e a época de infecção (FARIA *et al.*, 1996; GASPARIN *et al.*, 2005). Através da utilização de cultivares resistentes, o impacto econômico causado pelo BCMV teve um decréscimo nas últimas décadas (COSTA, 1987).

Outra virose que merece destaque, quando se fala da cultura do feijoeiro, é o mosaico dourado (BGMV), gênero *Begomovirus*. Esta doença induz a danos severos e proporciona perdas consideráveis. Danos acima de 50% em condições propícias à doença e perda de até 100%, em consequência da redução do peso e da qualidade dos grãos (BIANCHINI *et al.*, 1989). O “mosaico dourado”, muitas vezes, é causado por um complexo virótico estabelecido pela infecção mista do BGMV com outros *Geminivirus* e até mesmo com vírus de outros gêneros. Entre estes, os vírus isométricos, que associados a viroses do feijoeiro no Brasil constituem grupo bastante heterogêneo, englobando representantes dos gêneros *Comovirus*, *Cucumovirus* e *Sobemovirus* (COSTA, 1987).

São observadas as infecções entre o BGMV e o vírus da clorose infecciosa das malváceas (*Abutilon mosaic virus* – AbMV), gênero *Begomovirus*, chamado de vírus do mosaico anão. Já foi relatada a ocorrência entre BGMV com o vírus do mosaico da *Euphorbia* (*Euphorbia mosaic virus* – EuMV), gênero *Begomovirus* (COSTA, 1987). Outra infecção mista muito comum ocorre entre o BGMV e o vírus do mosaico rugoso (BRMV), gênero *Comovirus*, também denominado vírus do “mosaico-em-desenho” do feijoeiro (COSTA, 1987; BIANCHINI *et al.*, 1989). Também já foi constatada a ocorrência do BGMV com o BCMV; com o vírus do mosaico severo do caupi – estirpe feijão (*Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV), gênero *Comovirus*, bem como com o vírus do mosaico do feijoeiro do sul (*Southern bean mosaic virus* – SBMV), gênero *Sobemovirus* (COSTA, 1987).

A ocorrência da infecção mista entre o BGMV e outros vírus causa danos mais elevados do que na infecção individual. As deformações são

severas e as plantas apresentam superbrotamento, resultando em baixa produtividade ou até mesmo liquidando totalmente a lavoura (COSTA, 1987; BIANCHINI *et al.*, 1989).

Entre os vírus isométricos que compõem o complexo viral, destaca-se o BRMV, que em condições experimentais, têm sido responsáveis por perdas na produção de 11,2 a 72%, dependendo da cultivar (BIANCHINI *et al.*, 1997). Sua ocorrência é constatada em todo Estado do Paraná, onde já foram verificadas lavouras com mais de 50% das plantas com sintomas. Neste Estado, o vírus é observado com maior frequência na safra da seca, provavelmente devido à presença de insetos crisomelídeos que transmitem este vírus. Nessa época, o BRMV torna-se um problema sério em razão de sua ocorrência em infecções mistas com o BGMV, ocasionando perda total da capacidade produtiva do feijoeiro (BIANCHINI *et al.*, 2000).

Como já citado por Costa *et al.* (1981), o vírus do mosaico do feijoeiro do sul (SBMV) pode estar ocorrendo em infecções mistas com o BGMV. Embora as perdas referentes ao SBMV possam atingir 50% da produção das plantas infectadas, a sua ocorrência geralmente não é alta (MORALES e GÁMEZ, 1989). Este vírus pertencente ao gênero *Sobemovirus* é encontrado infectando feijoeiro na região do Distrito Federal (CUPERTINO *et al.*, 1982) e no Estado de São Paulo (COSTA, 1987).

O número das 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 e KITAJIMA, 1990). Portanto, é de fundamental importância para o desenvolvimento de cultivares resistentes, a identificação e o conhecimento dos isolados prevalentes numa determinada região, pois diferentes genes de resistência podem controlar a virulência de diferentes estirpes (BOARI e FIGUEIRA, 1996).

Assim como o feijoeiro, a soja está sujeita ao ataque de diversos patógenos, e com o passar do tempo estas doenças foram consideradas os principais fatores que limitaram a máxima produtividade da soja no Brasil,

ocasionando perdas indiretas através da ação dos patógenos e os gastos decorrentes para o controle dos mesmos. Com a expansão do cultivo de soja no Brasil, começaram a aparecer sintomas de doenças que, na sua maioria, já eram conhecidas e descritas nos países tradicionalmente produtores de soja (ALMEIDA, 2008).

O vírus do “mosqueado do feijoeiro” teve sua ocorrência descrita em campos experimentais da Embrapa-Cerrados, Planaltina e Distrito Federal, ocorrendo em soja Itiquira, nos anos de 1992 e 1993 (ANJOS *et al.*, 2000). Infecções por *Bean pod mottle virus* (BPMV) também foram relatadas em regiões de soja do sul e leste dos Estados Unidos e, em áreas endêmicas com alta população de insetos vetores, ocasionou a redução de até 40% do rendimento (GHABRIAL *et al.*, 1990).

O BPMV pertence ao gênero *Comovirus*, família Secoviridae, sendo assim transmitido por besouros da família Chrysomelidae. As plantas de soja quando infectadas apresentam sintomas de mosqueado verde-amarelo nas folhas e, em algumas cultivares, exibe aspecto de embolhamento e redução do porte. Este vírus tem como hospedeiras plantas da família Leguminosae e a espécie *Chenopodium quinoa* (ANJOS *et al.*, 2000).

Esta virose reduz drasticamente o rendimento de soja das cultivares de soja Garça Branca, Garimpo, Doko, Itiquira e Pioneira em condições experimentais; nas regiões produtoras do Brasil, devido à ampla ocorrência de *Cerotoma arcuata* e de sua eficiência como vetor do BPMV, este vírus pode disseminar-se e atingir níveis de dano econômico, ocasionando a necessidade de inspeção dos plantios comerciais e o mapeamento das regiões de ocorrência do BPMV em soja no Brasil (ANJOS *et al.*, 2000).

Segundo Vance *et al.* (1995) a co-infecção por mais de um vírus é comum nas plantas superiores, inclusive na soja, sendo estes relacionados ou não, são capazes de se replicar em uma mesma célula, interagindo de forma antagônica ou sinérgica. Essa interação sinérgica produz doença com sintomas mais severos do que os produzidos pela infecção de um único vírus ou pode provocar alterações na concentração de um ou ambos os vírus (POOLPOL e INOUE, 1986).

Ensaio realizados por Calvert e Ghabrial (1983) e por Anjos *et al.* (1992) demonstraram que a interação sinérgica entre BPMV com *Soybean mosaic potyvirus* (SMV) e BPMV com *Cowpea mosaic virus* (CPMV) acarretam um aumento de seis vezes na concentração de BPMV e de oito vezes na concentração de CPMV, respectivamente.

As perdas com a cultura da soja estão ligadas ao efeito direto do patógeno nas plantas, levando à queda do rendimento, assim como tendo ação direta sobre a qualidade das sementes colhidas, ocasionando o descarte de lotes de sementes. Atualmente, a maior parte das viroses descritas infectando a soja encontra-se na Ásia, Estados Unidos e América do Sul (ALMEIDA, 2008).

Desde 2001 a doença conhecida como a necrose da haste, de etiologia viral e transmitida pela mosca branca, *Bemisia tabaci*, tem sido observada infectando plantas de soja no sudoeste de Goiás, resultando em perdas severas entre as cultivares suscetíveis. Com o passar do tempo, o vírus foi disseminado para outras regiões, atingindo as lavouras do Maranhão, Mato Grosso, Bahia e do Paraná (ALMEIDA *et al.*, 2003).

A necrose da haste é uma doença causada pelo *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV), pertence ao gênero *Carlavirus*, assim denominados por Harrison *et al.* (1971), indicando como membro tipo o *Carnation latent virus* (CLV). Os vírus pertencentes ao gênero *Carlavirus* caracterizam-se por possuírem partículas com RNA monopartido, de fita única e com peso molecular variando de 2,3 a 3,0 x 10⁶ (6,4 - 8,6Kb), com o conteúdo de RNA variando de 5% a 8,5%, entre espécies desse gênero (VAN REGENMORTEL, 2000). A massa molecular da proteína capsidial, estimada por eletroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida, varia de 31 kDa a 39 kDa (BRUNT e KENTEN, 1973; GASPAR e COSTA, 1993; VAN REGENMORTEL, 2000; COHEN *et al.*, 2003).

Quando a soja é infectada pelo vírus da necrose da haste na fase inicial da lavoura, podem ser observados sintomas de curvatura e queima do broto, podendo a planta morrer ou originar plantas anãs, com folhas deformadas. Se a infecção é mais tardia, nem todas as plantas morrem, porém

ocorre uma redução do número de vagens, que podem apresentar pequenas lesões superficiais circulares e escuras ou lesões que cobrem toda a vagem. As plantas desenvolvem a necrose da haste, principalmente, após a floração. As folhas apresentam aspecto de mosaico, com diferentes tonalidades de verde, variando desde o esmaecido ao verde normal das folhas, e facilitam o diagnóstico no campo. Cultivares suscetíveis podem apresentar perda total da produção. A incidência de plantas mortas depende da população de mosca branca e da presença de plantas hospedeiras. Em testes com cultivares suscetíveis, concluiu-se que esse vírus não se transmite pelas sementes. (TECNOLOGIAS..., 2008).

Além da necrose da haste, a cultura da soja está sujeita ao ataque de diversas viroses como no caso da virose conhecida como Mosaico comum da soja, doença causada pelo *Soybean mosaic virus* (SMV), pertencente ao gênero *Potyvirus*. Esta virose foi identificada no Brasil em 1955, no estado de São Paulo, porém tem sua ocorrência relatada em todo o mundo, principalmente, porque é facilmente transmitida por sementes, além de diversas espécies de pulgões, como *Myzuz persicae*, *Acyrtosiphon dirhodum*, *Hysteroneura setariae*, *Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum maydis*. É importante observar que no Brasil não há pulgões infestando soja. A transmissão ocorre através de picadas de prova, de pulgões alados, com pousos casuais sobre plantas infectadas, o que termina por disseminar o vírus de plantas infectadas para plantas sadias (ALMEIDA, 2000).

As plantas infectadas pelo mosaico comum da soja podem apresentar redução do rendimento de até 70% dependendo da cultivar. No Brasil, a importância desta virose tem diminuído com o passar do tempo, a partir do surgimento de cultivares resistentes. Foi constatado que nos estados do Sul o controle biológico dos afídeos vetores desta virose tem reduzido à disseminação deste vírus (ALMEIDA *et al.*, 1997).

As plantas infectadas apresentam encarquilhamento e deformação dos trifólios, com algumas bolhas e apresentando áreas verde-claras e verde-escuras distribuídas irregularmente sobre o limbo foliar. Dependendo do isolado viral e do cultivar infectado, podem ser observadas lesões escuras nas

vagens. Em plantas infectadas até os 40 dias, as plantas podem apresentar redução do tamanho, tendo menor produtividade, conseqüentemente. Além disso, a maturação é atrasada e é comum encontrar plantas verdes entre plantas já amadurecidas (ALMEIDA *et al.*, 1997).

Descrita pela primeira vez nos Estados Unidos (1946) a queima do broto da soja é causada pela infecção do vírus da mancha anelar do fumo, *Tobacco ringspot virus* (TRSV). No Brasil, sintomas similares foram observados em plantas de soja sendo decorrentes da infecção pelo vírus da necrose branca do fumo, *Tobacco streak virus* (TSV), atualmente, existe há descrição de outros vírus causadores de sintomas semelhantes. Este vírus pertence ao gênero *Illavirus*, família Bromoviridae (ALMEIDA *et al.*, 1997).

Os danos causados à soja são variáveis e dependentes das condições climáticas (especialmente chuvas), bem como do local onde se instala a cultura da soja. Em algumas localidades do estado do Paraná, a soja ficou inviabilizada, pois os prejuízos eram totais. Em outras áreas foram observados que em anos secos ou quando as chuvas ocorrem em períodos bastante espaçados, existe o aparecimento de doenças (ALMEIDA, 2000).

Esta virose é transmitida por tripes do gênero *Frankliniella*, já nos Estados Unidos as espécies *F. schultzei* e *Trips tabaci* foram citadas como vetores. No estado do Paraná, as espécies *Frankliniella* sp. são facilmente encontradas a campo. O vírus causador da queima do broto da soja também é transmitido pelo pólen aderido ao aparelho bucal dos *tripes*, adultos ou larvas, em plantas de *Chenopodium amaranticolor*. No Paraná, em áreas onde a doença é endêmica, foi observada a ocorrência de uma hospedeira do vírus, conhecida por cravorana (*Ambrosia polystachya*), outras espécies vegetais naturalmente infectadas são o algodão, tomate, girassol, picão, amendoim, *Crotalaria* sp. e fumo. (ALMEIDA, 2000).

A doença conhecida como mosaico cálico da soja ocorre pela infecção da planta pelo *Alfafa mosaic virus* (AMV). Embora detectado inicialmente nos Estados Unidos ocorrendo em alfafa, sua ocorrência natural em soja sucedeu-se tempo depois no Brasil, mais exatamente no estado do Paraná, aparecendo a campo em baixa intensidade (ALMEIDA *et al.*, 1997).

Este vírus é transmitido por sementes de soja infectadas. As plântulas infectadas apresentam folhas primárias com áreas amarelas, nas folhas trifolioladas os sintomas variam de estrias amarelas até intensa clorose internerval ou clorose das bordas do trifólio, podendo sugerir fitotoxicidade ou até deficiência nutricional. A transmissão ocorre por várias espécies de afídeos de maneira não persistente. A transmissibilidade por sementes é uma característica importante na disseminação desta doença. Além da alfafa e soja, o vírus causador do mosaico cálico da soja pode infectar outras espécies como feijão, batata, tomate, ervilha e fumo, além de *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* (ALMEIDA, 2000).

Vale ressaltar que a transmissão por sementes produzidas em plantas infectadas é uma importante fonte de disseminação do vírus. Normalmente o vírus do mosaico cálico da soja causa pouca redução no desenvolvimento da planta. Em determinados casos, onde ocorrem plantas infectadas de forma experimental, as plantas exibem sintomas severos, seguida de uma recuperação e voltando mais tarde a exibir os sintomas de intenso mosaico amarelo (ALMEIDA, 2000).

Assim como o feijoeiro, a soja pode ser infectada pelo BRMV, nesse caso a doença é conhecida como mosaico rugoso ou mosaico em desenho. As plantas infectadas apresentam sintomas de mosaico severo, com leve encarquilhamento das folhas, às vezes apresentam formação de bolhas verde-escuras circundadas por áreas verde-claras, levemente translúcidas (ALMEIDA *et al.*, 1997).

Um interessante fato observado em plantas de soja infectadas com este vírus foi o aparecimento de sementes manchadas, semelhantes às induzidas pela infecção da planta pelo mosaico comum da soja. Também tem sido descrito na América Central e nos EUA, recebendo a denominação de vírus do mosaico rugoso do feijoeiro, pertencente ao grupo dos comovirus (ALMEIDA, 2000).

No Brasil o BRMV é transmitido por *Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa*. Há ainda a transmissão por *C. ruficornis*, *Diabrotica balteata* e *D. adelpha*. Entretanto, não se constatou a sua transmissão por sementes de

feijão. A ocorrência desta virose em soja pode gerar grandes perdas, dependendo do cultivar. Quando sucede em infecções mistas com outros vírus, como por exemplo, o mosaico comum da soja, pode ocorrer sinergismo, em alguns cultivares, o que pode acarretar em perdas de até 26% na produtividade (ALMEIDA *et al.*, 1997; ALMEIDA, 2000).

2.3 Família Secoviridae e Gênero Comovirus

A criação da ordem Picornavirales reformulou a taxonomia de um grande grupo de vírus, anteriormente descritos como 'picorna-like viruses'. Este grupo apresenta vírus com genoma monopartido ou bipartido e com organização genômica muito conservada (LE GALL *et al.*, 2008).

O gênero *Comovirus* está incluído na subfamília Comovirinae da nova família Secoviridae (SANFAÇON *et al.*, 2009). Os vírus da subfamília Comovirinae possuem propriedades similares com os Picornavirales, que infectam insetos e animais vertebrados, constituindo um grupo diversificado, que inclui uma grande variedade de vírus. A maquinaria genética de todos estes vírus codifica essencialmente um mesmo bloco de replicação de genes, utilizando mecanismos semelhantes, ligados à expressão gênica. Com base na análise filogenética envolvida na replicação viral, foram encontradas semelhanças que correlacionam estes vírus evolutivamente (ARGOS *et al.*, 1984; GOLDBACH, 1987; KOONIN e DOLJA, 1993; LE GALL *et al.*, 2005).

Estes vírus apresentam características em comuns, como uma proteína viral (VPg) covalentemente ligada à região 5' - terminal do RNA. Vírus da família Sequiviridae podem apresentar genoma monopartido ou bipartido; os membros do gênero *Comovirus* possuem genoma dividido em dois componentes de RNA (KARASEV *et al.*, 2001).

Dentre os vírus, os que apresentam RNA senso positivo, são os mais estudados devido ao fato de apresentarem características genéticas comuns entre si. Além da presença da proteína VPg, que está envolvida na replicação

do genoma viral, principalmente nas fases iniciais, são ainda codificados três importantes blocos de genes estruturais, como o bloco P1 codificador de dois blocos estruturais, VP1-VP4, que codificam proteínas do capsídeo e dois blocos de genes não estruturais, P2 e P3, associados na codificação de proteínas envolvidas no processo de replicação, como a helicase, VPg, protease e a RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) (KOONIN e DOLJA, 1993).

A RdRp é uma proteína essencial na replicação viral e tem sido observado que a região genômica codificadora desta enzima é altamente conservada entre todos os vírus de RNA senso positivo, portanto análises filogenéticas dessa região genômica são utilizadas em estudos de taxonomia evolutiva dos vírus de RNA (KOONIN e DOLJA, 1993; BUCK, 1996; RUECKERT e WIMMER, 1984).

Os *Comovirus* pertencem à subfamília Comovirinae da família Secoviridae (SANFAÇON *et al.*, 2009) em que também estão presentes os gêneros *Nepovirus* e *Fabavirus*, ambos divididos de acordo com o tipo de inseto vetor e relação sorológica. Os comovírus têm seu genoma dividido em duas moléculas de RNA de fita simples, de senso positivo, designados de RNA1 e RNA2 que são encapsulados separadamente em partículas icosaédricas com 28 a 30nm de diâmetro. O RNA 1 apresenta 5.900 nucleotídeos (n), enquanto que o RNA 2 apresenta aproximadamente 3.500 nucleotídeos. Os RNAs apresentam ainda uma VPg ligada covalentemente à região 5' e uma cauda poli-A na sua região 3' (CHEN e BRUENING, 1992b).

O RNA 2 produz duas poliproteínas com iguais extremidades carboxílicas, resultantes da tradução de sua própria ORF (*Open Reading Frame - fase aberta de leitura*) a partir de dois códons iniciadores na mesma fase. Uma delas é a proteína 24K que é a única com atividade de protease, sendo esta sintetizada pelo RNA 1, responsável pelo processamento de ambas as proteínas. Por sua vez, a proteína 87K possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA, e a proteína 58K possui atividade de helicase e possivelmente apresenta a função de âncora, para manter o complexo replicativo associado à membrana plasmática da célula. A VPg funciona como

iniciador da replicação do RNA, a protease 24K é vista como essencial para a replicação porque catalisa a proteólise que libera a VPg da poliproteína de 84 kDa, processo que aparentemente pode ocorrer durante a replicação do RNA (CHEN e BRUENING, 1992a e b; POUWELS *et al.*, 2002).

O RNA1 apresenta autonomia de replicação, porém os vírions completos são formados apenas na presença do RNA 2, que codifica as duas proteínas capsidiais (37K e 23K). O RNA 2 codifica as proteínas 58K e 48K, que com a mesma extremidade carboxílica estão envolvidas no movimento intracelular dos comovírus. Estudos ligados ao vírus do mosaico do caupi (CPMV), espécie tipo do gênero *Comovirus*, revelaram que todos os RNAs possuem uma ORF, sendo esta traduzida como uma única poliproteína. A ORF do RNA1 codifica proteínas que estão envolvidas na replicação, enquanto que o RNA2 codifica proteínas estruturais e proteínas requeridas para o movimento célula-a-célula. Tais proteínas formam túbulos que ligam as células infectadas de forma contígua, por onde passam os vírions. Sendo o RNA1 e o RNA 2 necessários para a infecção sistêmica da planta hospedeira (CHEN e BRUENING, 1992a e b; POUWELS *et al.*, 2002).

O genoma de diversos comovírus já foi sequenciado, e as sequências completas de ambos os RNAs estão disponíveis, como é o caso dos isolados de BPMV (U70866 e M62738) (DI *et al.*, 1999; MACFARLANE *et al.*, 1991), CPSMV (M83830 e M83309) (CAMPBELL e TOCHIHARA, 1969; CHEN e BRUENING, 1992a, 1992b), *Squash mosaic virus* (SqMV) (AB054688 e AF059533) (HAUDENSHIELD e PALUKAITIS, 1998; HAN *et al.*, 2002) (Figura 01).

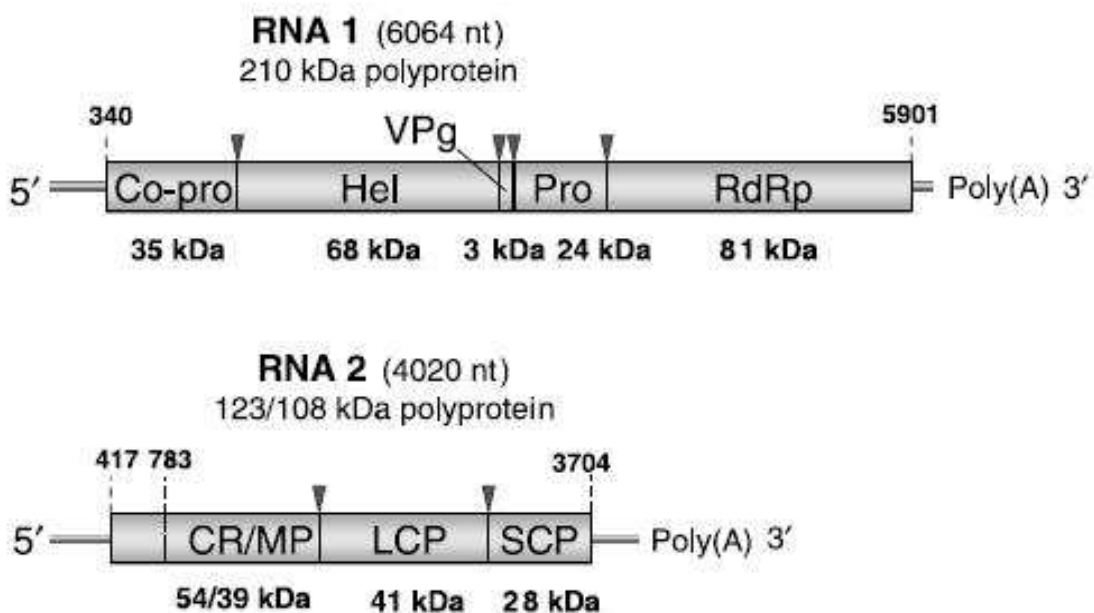


Figura 01 - Organização do genoma de um comovírus, representada através do genoma de um isolado japonês de *Radish mosaic virus*, segundo Komatsu *et al.* (2007).

O processo de replicação dos vírus de RNA é muito dependente da eficiente produção da RNA polimerase (RdRp) pela célula hospedeira, deste modo, espera-se que esta região genômica não sofra grandes modificações na sua sequência, apresentando-se muito conservada no genoma das diferentes espécies de um mesmo gênero de vírus (KOONIN e DOLJA, 1993).

Em 1991, Koonin, alinhando 46 sequências de 30 grupos de vírus, observou 380 posições consideradas semelhantes entre os vírus estudados, o que inclui oito “*motifs*” distintos de aminoácidos (*Motif* = resíduos conservados entre sequências alinhadas) 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 Secoviridae (KAMER e ARGOS, 1984; (SANFAÇON *et al.*, 2009)).

Dentro dos comovírus a RdRp é a região mais conservada codificada pelo RNA1; devido a essa característica, a sequência é muito utilizada como critério de diferenciação entre os comovírus, com isso, árvores filogenéticas são construídas com base nas análises comparativas destas sequências, fornecendo informações capazes de agrupar vírus de acordo com suas semelhanças genéticas. Através de estudos comparativos das sequências de aminoácidos, e com base em árvores filogenéticas construída através da análise das sequências de aminoácido correspondente a RdRp, algumas semelhanças foram constatadas entre BPMV, CPMV e *Red clover mottle virus* (RCMV) reunindo-os no mesmo grupo, no qual o CPSMV e SqMV estavam intimamente relacionados, enquanto *Radish mosaic virus* (RaMV) e *Andean potato mottle virus* (APMoV) estavam distantemente relacionados (KOMATSU *et al.*, 2007).

Estudos comparativos das sequências de RdRp podem fornecer informações que correlacionam à proximidade genética com vírus de mesma hospedeira, assim como existe a diferenciação entre comovírus que infectam exclusivamente leguminosas (BPMV, CPMV, CPSMV e RCMV) e comovírus que infectam hospedeiras não leguminosas (RaMV, SqMV e APMoV) (KOMATSU *et al.*, 2007).

A análise da sequência codificadora da RdRp pode fornecer base para a revisão da classificação taxonômica e filogenética dos vírus RNA senso positivo e, por esse motivo, tem sido usada para reconstruir relações evolutivas entre os vírus (KOONIN, 1991; BUCK, 1996; HATAYA *et al.*, 2000; KARASEV, 2000).

Uma longa e única ORF, semelhante a do CPSMV, está presente em todos os genomas de comovírus. A análise de alinhamentos de várias sequências correspondentes à codificação de poliproteínas revelou tais semelhanças, o que pode ser muito importante para estudos de caracterização taxonômica de novos comovírus (CHEN e BRUENING, 1992a, 1992b; DI e GHABRIAL, 1999).

A gama de hospedeiras dos comovírus é bastante restrita, aproximadamente 11 dos 15 membros do gênero infectam apenas espécies

vegetais da família Fabaceae. Quatro dos cinco comovírus para o qual a completa sequência nucleotídica de ambos os RNAs já foi determinada, apresentam estreita gama de hospedeiras, limitando-se apenas a leguminosas. Entretanto vários outros comovírus, incluindo o APMoV, RaMV e SqMV, infectam naturalmente plantas hospedeiras não-leguminosas. O RaMV e o *Turnip ringspot virus* (TuRSV), até o momento são os únicos comovírus conhecidos infectando crucíferas (KOMATSU *et al.*, 2007; RAJAKARUNA *et al.*, 2007).

2.4 Bean rugose mosaic virus

O primeiro relato da ocorrência de BRMV infectando plantas de feijão foi realizado na Costa Rica (GÁMEZ, 1972; 1982) e em seguida, foi reportada sua ocorrência na Guatemala (CARTÍN, 1973), em El Salvador (GÁLVEZ *et al.*, 1977), no Brasil (LIN *et al.*, 1981), na Colômbia (ACOSTA *et al.*, 1986), Honduras e Nicarágua (GÁMEZ, 1977).

No Brasil este vírus foi relatado ocorrendo primeiramente em lavouras de feijão no estado de São Paulo e descrita como mosaico-em-desenho do feijoeiro, apresentando sintomatologia similar à induzida pela infecção com BRMV em plantas de feijão (CAMARGO *et al.*, 1969), posteriormente a ocorrência desta virose foi observada no Distrito Federal (KITAJIMA *et al.*, 1980), no estado do Paraná (BIANCHINI *et al.*, 1985), em Minas Gerais e Goiás (ANJOS *et al.*, 1986). O agente etiológico desta doença foi então denominado "vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro", e posteriormente, com base no agrupamento dos comovírus em cinco serogrupos (FULTON e SCOTT, 1977), propuseram a inclusão do "vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro" no serogrupo do BRMV, sendo então considerada uma estirpe desse vírus (LIN *et al.*, 1981).

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

bolhas nas folhas, nanismo da planta e faixas verdes escuras nas nervuras. Este vírus possui uma gama de hospedeiras restrita, infectando as espécies *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba* e *Chenopodium amaranticolor* (GAMEZ, 1972, 1982). Em *Chenopodium quinoa* apresenta lesões cloróticas nas folhas inoculadas. Em *C. amaranticolor* as lesões encontradas são do tipo necróticas e sem infecção sistêmica (GÁMEZ, 1982).

Em plantas de soja os sintomas encontrados variam de acordo com a cultivar infectada, geralmente são encontrados além dos sintomas de mosaico, algumas bolhosidades e encrespamento das folhas, tendo também uma redução no porte da planta infectada (CUPERTINO, 1987). O mosaico é o sintoma característico desta doença. Entretanto, sintomas como bolhosidade, deformação foliar, lesões locais cloróticas, necróticas e também necrose de nervuras, podem ser observados em diversas cultivares de feijão. Já a queima do topo pode ocorrer em feijoeiros das cultivares 'Rico baio 1014' e 'Rico 23' (ANJOS *et al.*, 1994; COSTA, 1983).

A transmissão natural do BRMV é realizada por besouros *Chrysomelidae*. Os insetos vetores mais comuns são os dos gêneros *Cerotoma* e *Diabrotica*, tendo as espécies *C. arcuata* e *C. ruficornis* a transmissão mais eficiente (COSTA *et al.*, 1981; FULTON e SCOOTT, 1977; FULTON *et al.*, 1980; 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 (GALVEZ *et al.*, 1977; GAMEZ, 1972; MARTINS *et al.*, 1994; SPERANDIO, 1982).

Estudos de microscopia eletrônica de tecidos foliares de feijoeiros infectados com BRMV demonstraram alta concentração viral, além de inclusões citoplasmáticas cristalinas nas células (CAMARGO *et al.*, 1969, 1976; MUÑOZ e KITAJIMA, 1990). Através da microscopia de luz, 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 e KITAJIMA, 1990). A presença desses cristais é muito importante para a identificação do BRMV e sua distinção dentre os diversos vírus que também causam sintomas de mosaico em feijoeiro (EDWARSON e

CHRISTIE, 1978; MUÑOZ e KITAJIMA, 1990). Já foi relatada a presença de partículas parecidas com vírus dentro de vesículas ou bem próximas das membranas externas, esta localização pode ter alguma relação com o ciclo de replicação viral (ACOSTA *et al.*, 1986).

No Brasil, esta doença ainda não apresenta grande impacto à produção de feijão, por esta razão, nenhuma medida de controle tem sido recomendada até o momento, além do controle químico dos insetos vetores desta doença, que aparentemente está mantendo a incidência do BRMV em níveis toleráveis. Entretanto a ocorrência de BRMV em feijoeiro, sob condições favoráveis a doença, pode acarretar perdas consideráveis; esta virose reduz o rendimento da produção em diversas variedades, como o 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).

Quando a infecção viral ocorre mais cedo e/ou com infecção mista com outras viroses, é maior a redução no rendimento em grãos da cultivar (ANJOS *et al.*, 1994; BIANCHINI e BERGAMIN FILHO, 1994; COSTA, 1983; MARTINS *et al.*, 1994). Cultivos sucessivos, principalmente na região dos cerrados, podem aumentar a incidência desta doença, em razão da transmissão eficiente do vírus pelos insetos vetores e a presença de hospedeiros alternativos, facilitando a permanência dessa virose de uma safra para outra (ANJOS *et al.*, 1994).

O BRMV, assim como outros vírus, pode ser identificado através de métodos biológicos, sorológicos e moleculares. Os métodos biológicos apresentam alta sensibilidade, porém não diferenciam estirpes taxonomicamente próximas do mesmo vírus (HULL, 2002). A sorologia é o método mais comum e rápido para a identificação viral, porém necessita da disponibilidade de antissoros, o que limita a sua utilização em alguns locais. Alguns testes sorológicos são muito utilizados não só na virologia como também em outras áreas da Ciência, como é o caso do teste ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (HOUWERS *et al.*, 1982) e *Western blot* (AGRIOS, 2005).

A utilização de métodos moleculares na identificação viral tem aumentado consideravelmente com o passar dos tempos. O teste de RT-PCR ("reverse transcription – polymerase chain reaction") é muito utilizado no estudo de vírus que apresentam genoma composto por RNA. Esta técnica utiliza muitas vezes de oligonucleotídeos (*primers*) específicos ou então degenerados, dependendo do estudo a ser realizado. Como realizado por Souto *et al.* (2002) quando relatou a sequência parcial de nucleotídeos de um isolado de BRMV, utilizando um par de oligonucleotídeos correspondentes a uma sequência conservada de aminoácidos, obtiveram um fragmento de 600 nucleotídeos correspondente ao RNA2 do BRMV, que, quando comparada com as sequências já depositadas no GenBank, observou-se 39% de similaridade com a sequência de aminoácidos do RNA 2 de CPSMV e 44% com a sequência do BPMV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi parcialmente realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá e nos laboratórios de Virologia e Biotecnologia Vegetal da Embrapa - Soja em Londrina.

3.1 Purificação e Manutenção dos Isolados Virais

Os isolados do BRMV utilizados neste estudo foram obtidos de plantas de feijão que apresentavam sintomas característicos de infecção viral. Tais isolados foram coletados de plantas com sintomas provenientes de lavouras de feijão e de soja no Estado do Paraná, que já vinham sendo mantidos em casa de vegetação em plantas de feijão.

A manutenção destes isolados foi realizada em plantas de feijão da cultivar Rio Tibagi, através da inoculação mecânica das mesmas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, algumas folhas apresentando sintomas foram picadas e acondicionadas em solução tamponada de fosfato de sódio a 0,01 M e pH 7,0, mais glicerol (1:1; v/v) e mantidas em freezer, com a finalidade de serem utilizadas como fonte de inóculo no decorrer deste e de futuros trabalhos.

Para a purificação viral, sucessivas inoculações mecânicas com isolados mantidos em feijoeiro em casa de vegetação do IAPAR foram realizadas em plantas de feijão das cultivares Rio Tibagi e Carioca, plantas de sojas da cultivar Santa Rosa e também em plantas de *Crotalaria spectabilis*.

Uma vez obtido sucesso na separação dos isolados do BRMV de feijoeiro 'Rio Tibagi', as plantas foram transferidas para uma casa de vegetação da Embrapa – Soja, onde o isolado passou a ser mantido na mesma hospedeira através de inoculações periódicas.

Outro material utilizado neste estudo foi um isolado de BRMV de soja. Este material vinha sendo mantido em solução tamponada com glicerol no laboratório de virologia vegetal da Embrapa-soja e foi utilizado nas inoculações de plantas de feijoeiro 'Rio Tibagi'. Os isolados de BRMV foram mantidos através de inoculações periódicas em novas plantas de feijão 'Rio Tibagi', em casa de vegetação.

3.2 Inoculações Mecânicas

A inoculação mecânica foi realizada através da fricção do extrato de folhas de feijoeiro cv. Rio Tibagi infectados com BRMV, na superfície das folhas primárias de plantas sadias de feijão, previamente polvilhadas com abrasivo (carvão vegetal finamente moído), através da fricção do dedo indicador, com o extrato de plantas infectadas com BRMV. O inóculo foi feito com folhas de feijão cv. Rio Tibagi apresentando sintomas de mosaico e bolhosidade, maceradas em almofariz com a solução tamponada de fosfato de sódio a 0,01 M e pH 7,0, previamente resfriado. Logo após a aplicação do inóculo, as folhas foram lavadas com água corrente para evitar queima das folhas com o excesso de extrato e abrasivo. A inoculação foi feita quando o primeiro trifólio apresentava 2/3 do seu tamanho normal. Os experimentos foram conduzidos na Embrapa – Soja, em casa de vegetação, sem controle de temperatura.

3.3 Concentrações Relativas dos Isolados Virais pelo Teste ELISA Indireto

Para esta avaliação foi realizado um experimento em casa de vegetação com 55 vasos com aproximadamente 3 kg de solo adubado e esterilizado, contendo quatro plantas de feijão cv. Rio Tibagi por vaso. Estes vasos foram separados em três blocos de 16 vasos e as plantas foram

inoculadas quando o primeiro trifólio apresentava 2/3 do seu tamanho normal. As plantas do primeiro bloco foram inoculadas com BRMV isolado de feijoeiro, o segundo bloco teve as plantas inoculadas com BRMV isolado de soja e no terceiro bloco as plantas foram inoculadas com uma mistura dos dois isolados. A cada três dias após a inoculação, três trifólios de plantas distintas foram coletados. Foram realizadas seis coletas, destacando-se que a sexta e última coleta foi realizada quando as plantas estavam com 18 dias após a inoculação.

Para a realização do teste ELISA indireto, retirou-se um círculo de cada folha, com o auxílio de um furador, obtendo três círculos, de mesmo diâmetro por trifólio coletado. Cada material foi macerado em tampão de cobertura pH 9,6 obtendo solução 1: 10 (g/mL) e armazenadas a -18 °C. As amostras maceradas foram diluídas para a concentração de 1:20 e 1:200, 100µl de cada amostra foi colocado nos orifícios da placa. A placa contendo as amostras foi incubada a 4 °C, por 16 horas e mantida dentro de um recipiente fechado e umedecido. Após este período, a solução foi retirada da placa e esta lavada por três vezes com solução tampão PBS-Tween (phosphate-buffered saline-Tween). Aplicou-se na placa a imunoglobulina G (IgG), produzida na Embrapa Soja, na concentração de 1:200, incubada a 37 °C durante 2 horas. Após a incubação a placa foi novamente lavada três vezes com PBS-Tween, adicionando-se em cada orifício da placa 100µl de solução de antissoro anti-IgG (AntiRabbit IgG (Whole Molecule-SIGMA ®)) na concentração de 1:8000, incubando-se a 37 °C por 2 horas. Em seguida adicionou-se 100µl de substrato p-nitrofenilfostato (1g/mL). Após 30 minutos a leitura da placa foi efetuada em leitora automática de ELISA (Microplate Reader – Model 3550UV/BIO-RAD®) em absorbância de 405 nm, segundo protocolos de Almeida *et al.* (2001).

3.4 Purificações dos Isolados de *Bean rugose mosaic virus*

A purificação dos isolados em estudo foi realizada através do método de purificação de vírus segundo Sperandio (1982). Aproximadamente 100g de

folhas de feijoeiro cv. Rio Tibagi previamente infectadas foram trituradas em liquidificador com a solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (1g/2 mL) com 1% de sulfito de sódio e 0,01M de EDTA. O material foi então filtrado em gaze duplo, ao filtrado foi adicionado 25% do volume inicial de clorofórmio e 25% do volume inicial de butanol, durante agitação por 10 minutos. Em seguida o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi recolhido e acrescido de 8% do volume de PEG 6000 e agitado por 1 hora em câmara fria (10 °C). Após agitação o material com PEG foi então centrifugado por 15 minutos a 11.000 rpm e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em 20% do volume inicial de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, permanecendo em agitação por uma noite em câmara fria (10 °C). O material foi então centrifugado a 43.000 rpm durante duas horas, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 200µl de tampão fosfato de sódio 0,01M e pH 7,2; após este processo o precipitado permaneceu em repouso durante uma noite a 4 °C. O material teve o volume completado para 10 mL e realizado uma almofada de sacarose 40%, centrifugado a 48.000 rpm durante duas horas e trinta minutos. O precipitado foi ressuscitado em 500µl em água esterilizada e centrifugado a 1000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante da etapa anterior foi coletado e utilizado em colchão de sacarose 20% congelado, posteriormente centrifugado a 38.000 rpm durante 90 minutos, a leitura do RNA foi realizada através do fracionador ISCO, com luz ultravioleta (254 nm).

3.5 Caracterização Molecular dos Isolados

3.5.1 Extração do RNA Total

A extração do RNA total foi realizada através de dois métodos. No primeiro método utilizou-se Trizol (Invitrogen), que consiste numa etapa de homogeneização elaborada a partir da maceração em nitrogênio líquido de 50

a 100 mg de tecido foliar de feijoeiro, infectados com os isolados virais provenientes de feijão e soja, em um microtubo, com adição de 1 mL de Trizol, seguido de agitação manual.

Após a adição do reagente Trizol as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura de 15 a 30 °C. Para a purificação da amostra foi adicionado 200 µL de clorofórmio (0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol). As amostras foram agitadas manualmente e incubadas à temperatura de 15 a 30 °C por 3 minutos. Ao término da incubação, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm, à temperatura de 5 °C, durante 15 minutos, o que possibilitou ao final desta etapa, observarmos 3 fases distintas. O sobrenadante foi então recuperado e transferido para um novo tubo, para precipitar o RNA foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico, cada tubo foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos, a temperatura de 5 °C, a 8000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado ao fundo do tubo foi lavado com 1000 µL de etanol a 75%, misturado rapidamente em um agitador do tipo vortex. Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm, a temperatura de 5 °C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado obtendo-se o pellet de RNA que foi seco e dissolvido com 45 µL de H₂O-DEPC. Depois de dissolvido, o RNA Total (RNA vegetal e viral) foi utilizado imediatamente nas reações de RT-PCR e o RNA total restante foi armazenado a -80 °C.

O segundo método utilizado para a extração de RNA Total foi a combinação do kit de extração RNeasy System (Qiagen) com o protocolo anterior (Trizol), quando 100 mg de folhas feijão, apresentando sintomas típicos da infecção por BRMV, foram trituradas em nitrogênio líquido. Aproximadamente 75 mg deste preparado foram depositados em um microtubo de 1,5 mL, sendo adicionado, posteriormente, 1 mL de Trizol, seguido de uma vigorosa homogeneização durante 2 minutos, em um agitador do tipo "Vortex". O material resultante foi centrifugado a 12.000 rpm, durante 10 minutos, sendo a fase líquida superior transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 200 µL de clorofórmio e seguido novamente por centrifugação a

12.000 rpm, por 10 minutos. A fase aquosa superior formada nessa etapa foi recolhida para um novo tubo, adicionando-se 200 µl de Etanol a 100% e homogeneizando-a com o auxílio de uma pipeta; essa mistura final foi, então, depositada na coluna de cor ROSA do Kit RNeasy e centrifugada por 15-25 seg, a 8.000 rpm. O filtrado resultante foi descartado.

À mesma coluna (cor rosa), adicionou-se 700 µl de “Washing Buffer” RW1, que foi centrifugada por 15-25 segundos, a 10.000 rpm, descartando-se o filtrado desse processo. A essa coluna, novamente, adicionou-se 500 µl do “Wash Buffer” RPE, centrifugado por 2 minutos, a 10.000 rpm, repetindo-se essa etapa duas vezes. Após estes procedimentos, a coluna foi depositada sobre um novo microtubo e, ao centro da coluna, foi adicionado 45 µl de água DEPC, seguido de centrifugação por 1 minuto, a 10.000 rpm, para diluir o RNA. O RNA total foi utilizado nas reações de RT-PCR seguintes.

3.5.2 Reações de Transcrição Reversa (RT-PCR)

Para as reações de transcrição reversa do RNA viral em cDNA, foram testados alguns protocolos para se determinar qual destes melhor atenderia às nossas necessidades.

O primeiro protocolo utilizado foi o descrito por Yang e Mirkov (1997), com modificações; os reagentes foram adicionados em um tubo de microcentrífuga de 200 µl, na seguinte ordem: 4 µL do RNA Total, 4 µL do oligonucleotídeos (*Primers*) iniciador hexâmeros randômico (pd(N)6 – INVITROGEN™), 2 µL dNTP mix (10 mM) e 3 µl de DEPC H₂O. Os tubos contendo o mix descrito acima foram levados ao termociclador e incubados a 65 °C, por 5 minutos, e, em seguida, resfriados no gelo por 1 minuto e, então, adicionado a cada reação 4 µL do tampão de reação 5X RT Buffer (0,5 M Tris-HCL; 0,7 M KCL; 0,1 M MgCl₂ pH 8,0), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL dithiothreitol (DTT 0,1 M) e 1 µL de RNase out. Estes reagentes foram

levemente homogeneizados, centrifugados brevemente e incubados a 25 °C, por 2 minutos. Foi acrescido 1 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV-INVITROGEN™) aos reagentes, que foram incubados a 25 °C, por 10 minutos, seguido de incubação a 42 °C, por 50 minutos. O cDNA produzido nesta reação foi armazenado a -80 °C para a utilização nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

O segundo protocolo foi realizado testando dois *Primers*, um oligoDT e *primers* hexâmeros randômicos. Ambos obedecendo a seguinte ordem, primeiramente 3 µL do RNA Total, 2 µL do *Primer* iniciador e 3 µL de DEPC H₂O foram depositados em tubos de microcentrífuga, levados ao termociclador e aquecidos a 80 °C durante 3 minutos e em seguida, resfriados no gelo, sendo adicionado à reação 4 µL do tampão de reação 5X RT Buffer (0,5 M Tris-HCL; 0,7 M KCL; 0,1 M MgCl₂ pH 8,0), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de dithiothreitol (DTT 0,1 M), 2 µL dNTP mix (10 mM), 1 µL de RNase out e 1 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV-INVITROGEN™). Estes reagentes foram levemente homogeneizados, centrifugados e incubados 65 °C, por 60 minutos, sendo o cDNA armazenado a -80 °C.

Foi testada uma reação de transcrição reversa, utilizando 10 µL do RNA Total, 2 µL do *Primer* iniciador (oligoDT) aquecido em termociclador a 80 °C durante 3 minutos e, em seguida, resfriados no gelo. Foi acrescentado à reação um mix de reagentes elaborado com 6 µL do tampão de reação 5X RT Buffer (0,5 M Tris-HCL; 0,7 M KCL; 0,1 M MgCl₂ pH 8,0), 1 µL dNTP mix (10 mM), 2 µL dithiothreitol (DTT 0,1 M), 1 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV-INVITROGEN™) e 6 µL de DEPC H₂O, que foram incubados a 37 °C, por 1 hora, seguido de incubação a 65 °C, por 10 minutos. O cDNA gerado nesta reação também foi armazenado a -80 °C para a utilização nas reações de PCR.

3.5.3 Reações de Semi-Nested RT-PCR

Para a realização desta etapa, foi utilizado como base o protocolo proposto por Maliogka *et al.* (2004) utilizado na identificação de diferentes espécies virais pertencentes à família Secoviridae.

Tabela 01 – Sequências de *Primers* degenerados sugerida por Maliogka *et al.* (2004) usado na identificação de isolados virais dos gêneros *Nepovirus*, *Comovirus* e *Fabavirus* (Secoviridae).

PRIMERS	SEQUÊNCIAS
ComF1	5'-ACIWSIGARGGITWYCC-3'
ComR2	5'-AVRTRTRTCRTCICCRTA-3'
ComNeF3	5'-TACGWSGGARGGGTGWYCC-3'
ComNeR4	5'-ARRTRTRTCRTC GCCRTAIAC-3'
ComNeR5	5'-AVRTRTRTCRTC GCCRTAIGT-3'

$W = A + T$; $S = G + C$; $R = A + G$; $Y = C + T$; $V = G + A + C$; $I = \text{Ensina}$.

Inicialmente foi realizada uma reação de PCR utilizando 5 μL do cDNA obtido na etapa anterior, 2 μL do tampão da reação 10X PCR-Buffer (0,5 M Tris-HCL; 0,7 M KCL; 0,1 M MgCl_2 pH 8,0); 0,6 μL MgCl_2 (25 mM); 1,6 μL dNTP mix (10 mM); 1 μL de DMSO 5% (dimetilsulfóxido); 3 μL dos *Primers* ComF1 e ComR2; 0,3 μL da enzima *Taq* DNA polimerase e 5,5 μL de DEPC H_2O . As reações permaneceram no termociclador previamente programado para 1 ciclo de 94 °C (2 minutos), 5 ciclos de 95 °C (30 segundos), 40 °C (10 segundos), 37 °C (5 segundos), 72 °C (30 segundos), seguido de 35 ciclos de 95 °C (30 segundos), 42 °C (30 segundos), 72 °C (25 segundos), seguido de uma extensão de 72 °C (2 minutos).

Ao término da reação de PCR, foi então realizada uma reação de Semi-Nested RT-PCR com 5 μL do PCR obtido na etapa anterior, 2 μL do

tampão da reação 10X PCR-Buffer (0,5 M Tris-HCL; 0,7 M KCL; 0,1 M MgCl₂ pH 8,0); 0,6 µL MgCl₂ (25 mM); 1,6 µL dNTP mix (10 mM); 1 µL de DMSO 5% (dimetilsulfóxido); 3 µL dos *Primers* ComNeF3, ComNeR4 e ComNeR5; 0,3 µL da enzima *Taq* DNA polimerase e 2,5 µL de DEPC H₂O. As reações foram levadas ao termociclador para um ciclo de 94 °C (2 minutos), 3 ciclos de 95 °C (30 segundos), 48 °C (30 segundos), 72 °C (20 segundos), seguido de 37 ciclos de 95 °C (30 segundos), 50 °C (30 segundos), 72 °C (25 segundos), seguido de uma extensão de 72 °C (2 minutos).

Amplificações foram obtidas após a substituição do reagente DMSO 5% como proposto no protocolo original, por 1 µL de BSA, nas reações de PCR e de Nested-PCR posteriores.

Os resultados do Semi-Nested-RT-PCR foram observados em géis de agarose a 1%, preparados com tampão SB. A separação foi realizada por eletroforese horizontal com 120 volts por 1 hora, após este período os géis foram incubados em solução de brometo de etídio, as imagens foram capturadas com luz UV. O marcador utilizado foi o DNA Ladder 100 pb (INVITROGEN™).

3.5.4 Purificação do material amplificado nas reações de semi-nested RT-PCR

A purificação do material amplificado (bandas visualizadas no gel) foi realizada utilizando tubos de microcentrífuga de 1,5 mL pesados antes e depois que as bandas foram recortadas do gel. Foram então adicionados 3 µL do tampão GS1 por mg/gel, sendo o material aquecido a 50 °C durante 5 minutos para fundir a partícula de gel onde a banda se encontrava. Uma vez que o material já estava dissolvido foi transferido para a coluna (kit-Purelink da Invitrogen), ficando em repouso por 1 minuto e centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi então descartado e a coluna foi lavada com 700 µL da solução W9, o material permaneceu por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto, novamente o filtrado

foi descartado. A coluna foi então submetida a uma nova centrifugação (12.000 rpm por 1 minuto) para que pudesse secar, após este processo foi adicionado à coluna 20 µL de tampão TE, permanecendo em repouso por 1 minuto, para que o material contido na coluna pudesse ser eluído e em seguida coletado através de uma centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos. O material coletado após a última centrifugação foi armazenado a -20 °C.

Outro protocolo para a purificação das amostras amplificadas por Semi Nested-PCR foi realizado através da utilização do kit Ultrafree[®]-DA, DNA *Extraction From Agarose Gels*, Range: 100-10,000pb DNA (MILLIPORE[®]), que consiste basicamente na coleta da banda a ser purificada, transferida para um tubo de ultracentrífuga com filtro, centrifugado a 8000 rpm durante 10 minutos. O material filtrado foi então armazenado a -20 °C, para posterior utilização nos processos de clonagem.

3.6 Clonagens e Sequenciamento

3.6.1 Preparo de células eletrocompetentes de *Escherichia coli*

Esta etapa teve início com a obtenção de colônias isoladas de *E. coli* a partir do estoque em glicerol. Um pré-inóculo foi estabelecido a partir de uma colônia bacteriana crescida durante aproximadamente 18 horas (uma noite) em 10 ml de meio LB (*Luria – Bertani*) a 37 °C, sob agitação (200 rpm).

Com o pré-inóculo já estabelecido, 5 mL do mesmo foi adicionado a 500 mL de meio LB e mantido a 37 °C sob agitação (300 rpm), até atingir a OD₆₀₀ 0,5 a 0,7, lida em espectrofotômetro. As células foram mantidas no gelo por aproximadamente 20 minutos. Em condições assépticas as células bacterianas foram transferidas para tubos (250 mL) de centrífuga pré-resfriados no gelo. Esse material foi centrifugado a 7.500 rpm por 15 minutos a 4 °C utilizando rotor Sorvall-SL250T. O sobrenadante foi então descartado e o

"pellet" foi ressuspensionado em 500 mL de glicerol 10% gelado, sendo então centrifugado novamente a 7500 rpm por 15 minutos a 4 °C, utilizando o mesmo rotor. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" novamente ressuspensionado em 250 mL de glicerol 10% gelado e centrifugado nas mesmas condições da etapa anterior. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e dessa vez o "pellet" foi ressuspensionado em 20 mL de glicerol 10% gelado e transferido para tubos de 30 mL estéreis que foram centrifugados a 7200 rpm por 15 minutos, a 4 °C utilizando rotor Sorvall-SL50T; o sobrenadante da última centrifugação foi descartado e o "pellet" ressuspensionado em 2 mL de glicerol 10% gelado, distribuídos em alíquotas em tubos de 2 mL e armazenados em ultra-freezer (-80 °C).

3.6.2 Transformação e eletroporação

Para a reação de transformação foi utilizado o kit TOPO[®] TA Cloning[®], em que cada reação foi preparada com 0,5 µL de DEPC H₂O; 1 µL de salt solution, 3,5 µL do DNA purificado e 1 µL do "TOPO".

Para a eletroporação, 40 µL de células eletrocompetentes foram homogeneizadas gentilmente em um microtubo de 1,5 mL com 2 µL do cDNA já ligado ao plasmídeo anteriormente e incubado em gelo por 1 minuto. As células e o DNA foram transferidos para uma cubeta pré-resfriada em gelo, previamente seca e colocado na câmara do eletroporador previamente calibrado para 2,5 kV, 25 µF, para pulso de 200 ou 400 ohms. A cubeta foi removida imediatamente do eletroporador, e adicionou-se 1 mL de meio SOC, em seguida esta mistura foi transferida para tubos contendo 15 mL de meio SOC, incubados a 37 °C por 1 hora sob agitação (225 rpm). No período de 1 hora em que o material ficou crescendo, placas contendo meio LB mais ampicilina (100 µg/placa) receberam 60 µL de IPTG/X-Gal (50 µL de IPTG 0,1M e 10 µL de X-Gal 50mg/mL) que foram imediatamente espalhados nas placas com auxílio de uma alça de vidro, as placas ficaram em repouso durante 30

minutos. Após o desenvolvimento bacteriano, 400 μ L de cada material foram espalhados nas placas que já estavam previamente plaqueadas com IPTG/X-Gal. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C durante uma noite, para que fosse possível coletarmos somente as colônias brancas, ou seja, as colônias que possivelmente receberam o inserto de interesse.

3.6.3 Preparação de plasmídeos em microplacas (MINIPREP)

Com auxílio de um palito de dente estéril, colônias brancas foram inoculadas individualmente nos poços (1 mL de v/poço) da placa. A placa foi selada com adesivo, e o mesmo recebeu dois pequenos furos por poço, facilitando a aeração. A placa foi incubada a 37 °C, 320 rpm por 22 horas. Após a incubação, o material foi centrifugado a 4000 rpm por 6 minutos, o adesivo foi então removido e o sobrenadante descartado através da inversão da placa. Foram adicionados 200 μ L de GET (Glicose 20%; EDTA 0,5M pH 8,0; 1M Tris-HCL pH 7,4) por poço; a placa foi novamente selada e agitada (vortex) por 2 minutos para ressuspensão de todo o material celular contido no fundo dos poços, seguido de uma centrifugação de 4000 rpm por 9 minutos a 4 °C; o adesivo foi retirado e o sobrenadante novamente descartado, deixando a placa invertida sobre o papel toalha por alguns instantes.

Uma mistura de 6 mL de GET + 500 μ L de RNase A (10 mg/mL) foi preparada em um recipiente (quantidade suficiente para uma placa), então o material foi ressuspensionado em 65 μ L desta mistura (GET + RNase), sendo transferido para os orifícios de uma microplaca de fundo em U. A cada poço foi adicionado 65 μ L de NaOH 0,2N, e SDS1%. A placa foi novamente selada com adesivo e a homogeneização dos materiais foi realizada por inversão (10 vezes), permanecendo em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente. Uma rápida centrifugação foi realizada para retirar toda a solução do adesivo. Adicionou-se a cada poço 60 μ L de KOAc 3M (KOAc 5M; ácido acético glacial; H₂O milliQ), selando a placa e invertendo-a por 10 vezes,

incubando o material no gelo durante 10 minutos, seguindo de uma centrifugação de 4000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C.

Fixou-se com fita adesiva uma placa Millipore (MAGVN22) sobre uma microplaca de fundo em "V", verificando se os poços estavam bem alinhados. Foi transferido cuidadosamente 100 µL do sobrenadante, evitando-se transferir os resíduos celulares para a placa Millipore e após centrifugou-se por 5 minutos, a 4000 rpm a 4 °C, ou até todo o volume descer para a placa de fundo em "V". Ao final do processo a placa Millipore foi descartada e adicionou-se 90 µL de isopropanol ao filtrado, selou-se a placa e inverteu-se a mesma por 10 vezes, seguindo de uma centrifugação de 4000 rpm, por 45 minutos a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. A cada poço da microplaca foram adicionados 150 µL de etanol 70% gelado. Centrifugou-se o material a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante, e invertendo-se a placa sobre papel absorvente por alguns minutos, a placa permaneceu em repouso, estando coberta com papel toalha, durante 60 minutos à temperatura ambiente. Ao final desse processo, foram adicionados 30 µL de H₂O MilliQ autoclavada por poço; a placa foi selada e mantida “*overnight*” a 4 °C (geladeira), para que nesse período o material pudesse ser ressuscitado, e posteriormente armazenado a -20 °C.

3.6.4 PCR de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas utilizando o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism” Versão 3.1, conforme orientação do fabricante.

3.6.5 Preparo das amostras e sequenciamento dos fragmentos obtidos

Os fragmentos foram sequenciados em um aparelho ABI3100 – Applied Biosystems, em sistema capilar.

3.6.6 Análise das sequências

Os eletroferogramas produzidos após o sequenciamento foram submetidos ao pacote de programas "Phred/Phrap/Consed" (GORDON *et al.*, 1998) para se analisar a qualidade das sequências, visualizar o resultado graficamente e gerar os arquivos no formato fasta (sequência de bases antecedida pelo sinal ">" e seu nome). Estes arquivos foram analisados pelo programa Contgen.pl e tiveram as sequências menores que 100 nucleotídeos com qualidade superior a 20 descartadas, para permitir maior confiabilidade nos resultados. Posteriormente as sequências no formato fasta foram submetidas ao programa BLAST - "Basic Local Alignment Search Tools" (ALTSCHUL *et al.*, 1997), comparando-se as sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de sequências do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), verificando os valores de identidade, "score", "e-value" e alinhamento das sequências.

As sequências de vírus da família Secoviridae depositadas no GenBank foram alinhadas com a sequência do BRMV obtida neste trabalho, através do programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997). Para construção da árvore filogenética foi utilizado o algoritmo "*neighbor-joining*" do programa MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007). O alinhamento global das sequências para análise dos *motifs* foi realizado no programa CLUSTALW-2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) utilizando a matriz PAN.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado da purificação biológica dos vírus do feijoeiro em soja, *Crotalaria*, feijão 'Carioca', feijão 'Rio Tibagi' e também em plantas indicadoras, obteve-se um isolado de BRMV, o qual induz na cv. Rio Tibagi sintomas de mosaico intenso e rugosidade, semelhantes aos sintomas relatados por Anjos *et al.* (1994) e por Costa (1983) (Figura 02). Sintomas de bolhosidade foram observados em plantas de soja cv. Santa Rosa, como já relatado por Cupertino (1987).

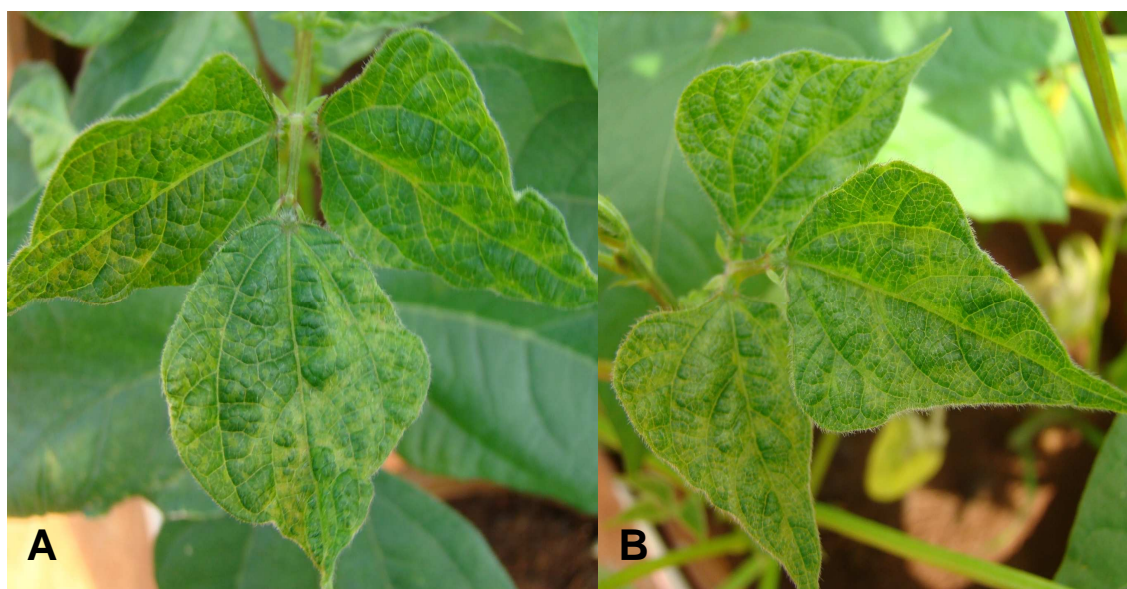


Figura 02 - Sintomas de mosaico intenso e rugosidade em folhas de feijão cv. Rio Tibagi induzidos pelos isolados de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) de feijoeiro (A) e de soja (B).

Entre as plantas indicadoras, observaram-se sintomas de lesões locais cloróticas, desencadeando posteriormente lesões locais necróticas em *Chenopodium amaranticolor* (Figura 03), ao contrário do observado por Castillo-Urquiza *et al.* (2006) que verificou estes sintomas *Chenopodium quino*, quando trabalhou com um isolado de BRMV. Entretanto, ambos os sintomas

mencionados estão de acordo com os dados de literatura para o BRMV (GAMEZ, 1982).



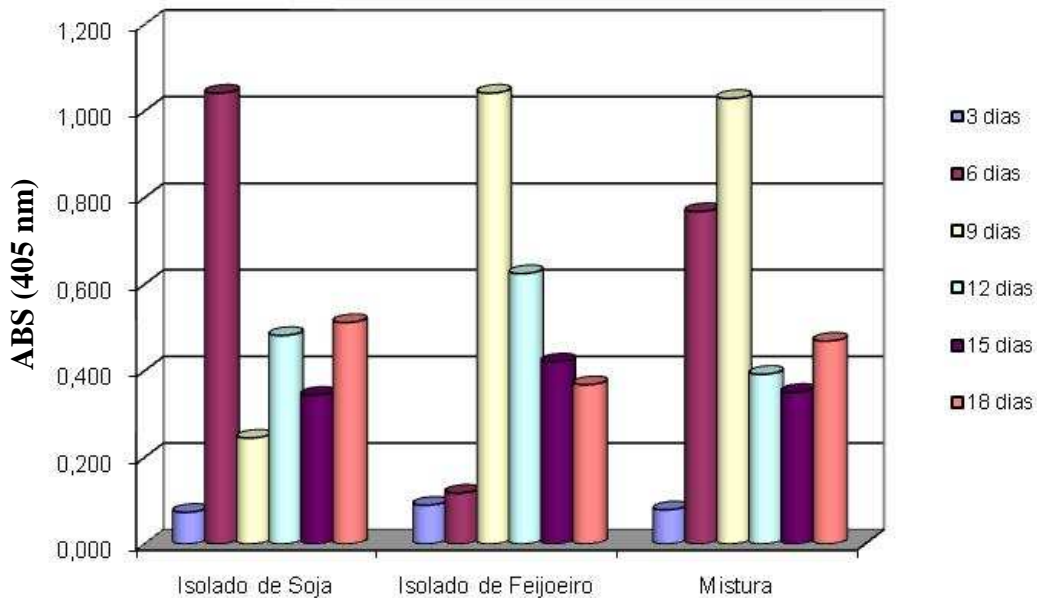
Figura 03 - Sintomas em plantas de *Chenopodium amaranticolor*, mostrando lesões locais cloróticas e necróticas, induzidas pela infecção do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV).

4.1 Concentração Relativa de Vírus Determinada por ELISA Indireto

Através do teste Elisa indireto foi observado que a concentração relativa do isolado de soja do BRMV, mostrou-se maior que a concentração do isolado de feijoeiro em plantas de 'Rio Tibagi' inoculadas. Esperava-se que a taxa de replicação dos isolados fosse semelhante, entretanto as folhas de 'Rio Tibagi' inoculadas com o isolado de soja, coletadas no 6º dia, apresentaram maior concentração de vírus do que os materiais coletados em datas posteriores.

Quando foram avaliadas as plantas de 'Rio Tibagi' inoculadas com o isolado de feijoeiro, foi observado que no 9º dia após a inoculação as plantas apresentaram maior concentração viral. Nas plantas de feijoeiro inoculadas com a mistura dos 2 isolados de BRMV foram observadas maiores concentrações no intervalo do 6º ao 9º dia após a inoculação, indicando que na

infecção mista, provavelmente a taxa individual de replicação de cada isolado foi mantida (Figura 04).



Isolados de *Bean rugose mosaic virus*

Figura 04 - Concentração relativa de vírus determinada por Elisa indireto em plantas de feijão cv. Rio Tibagi, inoculadas com os isolados de *Bean rugose mosaic virus* de soja, de feijoeiro e infecção mista (mistura de ambos os isolados).

4.2 Purificações dos Isolados de *Bean rugose mosaic virus*

Com a purificação dos isolados de BRMV de soja e do feijoeiro, e posterior análise de fracionamento do material em gradiente de sacarose a 20%, congelado, permitiu-se observar três picos de leitura de absorvância que foram correlacionados com os componentes virais de *Comovirus*, T= componente superior (T = *Top component*); M = componente médio (M = *middle component*); B = componente inferior (B = *bottom component*), assim como os descritos por Gamez (1982). Em geral as partículas de comovírus e nepovírus apresentam os três componentes, T, M e B, no qual o componente B apresenta uma única molécula de RNA1 e o componente M apresenta uma

molécula de RNA2; entretanto, o componente T não apresenta ácido nucléico, sendo considerado com uma partícula vazia (MURPHY *et al.*, 1995).

Comparando-se os resultados obtidos nos gráficos de leitura dos fracionamentos das preparações purificadas de ambos os isolados do BRMV (Figura 05), observou-se que possivelmente existe uma diferença na taxa de replicação de cada isolado, assim como anteriormente observado nos testes Elisa indireto. Entretanto, para que os resultados possam ser considerados conclusivos, são necessárias purificações adicionais de cada isolado, que deverão ser realizadas a partir de materiais inoculados e coletados em intervalos de tempo previamente definidos, uma vez que foram obtidas variações nas concentrações relativas dos componentes virais, conforme a purificação, sendo estes resultados semelhantes aos descritos por Acosta *et al.* (1986).

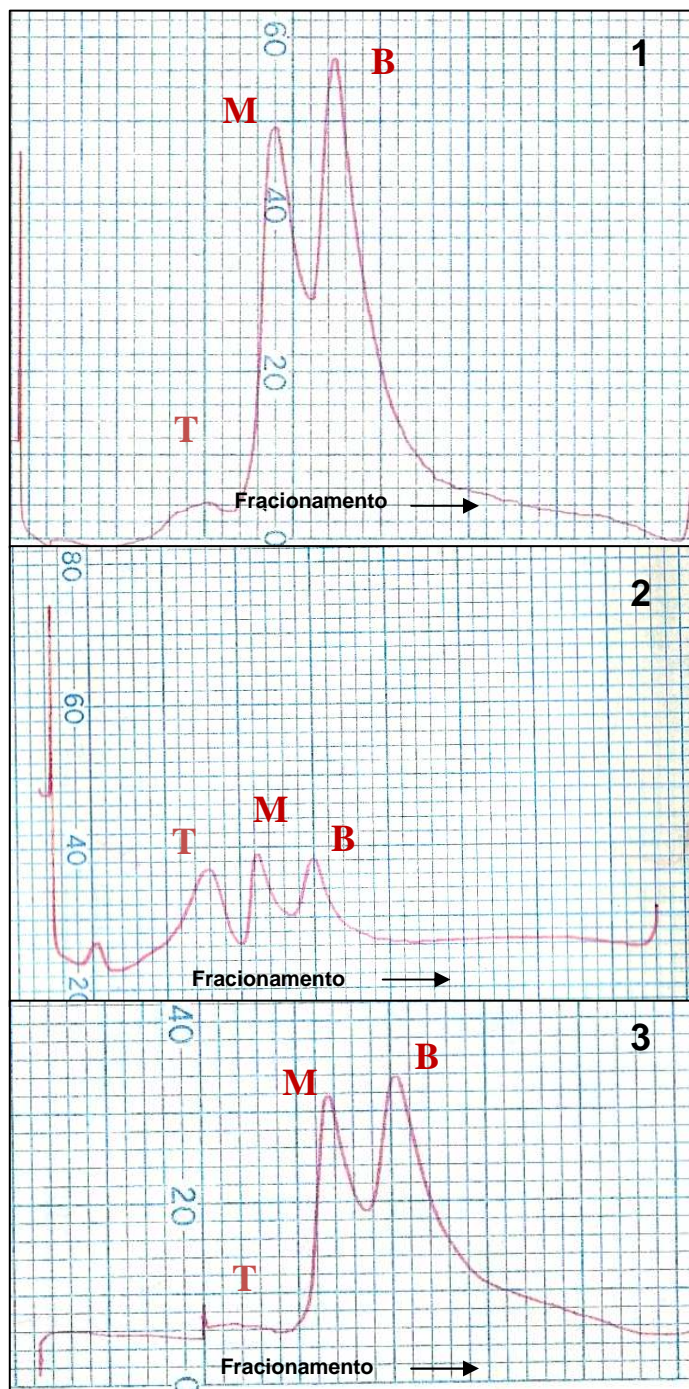


Figura 05 - Resultados das leituras obtidas em fracionador ISCO, absorvância (254 nm), de preparações purificadas em gradiente de sacarose a 20%. Os picos de leitura em cada gráfico foram correlacionados aos componentes virais de *Comovirus* (T = componente superior, M = componente médio, B = componente inferior). **1** – *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) isolado de soja, **2** - BRMV isolado de feijoeiro e **3** - Infecção mista.

4.3 Caracterização Molecular dos Isolados de BRMV

O método de extração de RNA total utilizando o kit de extração *RNeasy System* (Quiagen®) combinado com o reagente Trizol®, mostrou-se eficiente na obtenção de RNAs totais de qualidade, sendo portanto o método utilizado (Figura 6). O RNA total foi armazenado em ultra freezer (-80 °C), para diminuir os riscos de degradação rápida.

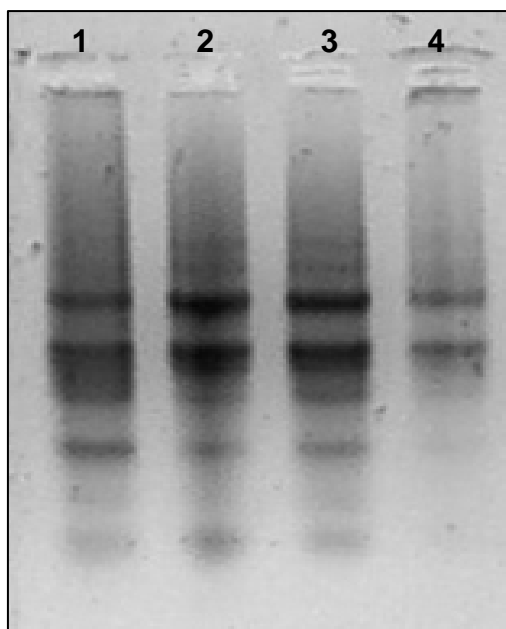


Figura 06 - Resultados de extrações de RNA Total, separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio, utilizando a combinação do kit RNeasy (Quiagen®) com o reagente Trizol®. **1 e 2** - materiais infectados com o isolado de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) de feijoeiro; **3 e 4** - materiais infectados com o isolado de BRMV de soja.

Para otimizar as reações de RT-PCR foram necessários ajustes na metodologia descrita por Maliogka *et al.* (2004), alterando-se as condições das reações de síntese de cDNA.

As amplificações de PCR passaram a ser obtidas após a substituição de 5% de DMSO (dimetilsulfóxido), como proposto por Maliogka *et al.* (2004), por BSA (albumina sérica bovina). A adição de BSA contribuiu para uma maior homogeneidade entre as amostras e principalmente na eliminação de reações falhas, assim como relatado por Carvalho e Vieira (2001).

O tamanho dos fragmentos amplificados a partir dos materiais de BRMV foi semelhante ao obtido por Maliogka *et al.* (2004) na amplificação de produtos de semi-nested RT-PCR de aproximadamente 737–789 pb, de uma região conservada (RdRp) do RNA1 de Secoviridae (Figura 07). A aplicação por semi-nested RT-PCR é uma solução utilizada devido à baixa eficiência nas amplificações com *primers* degenerados durante as reações de PCR inicial, como observado por Dovas e Katis (2003a, 2003b).

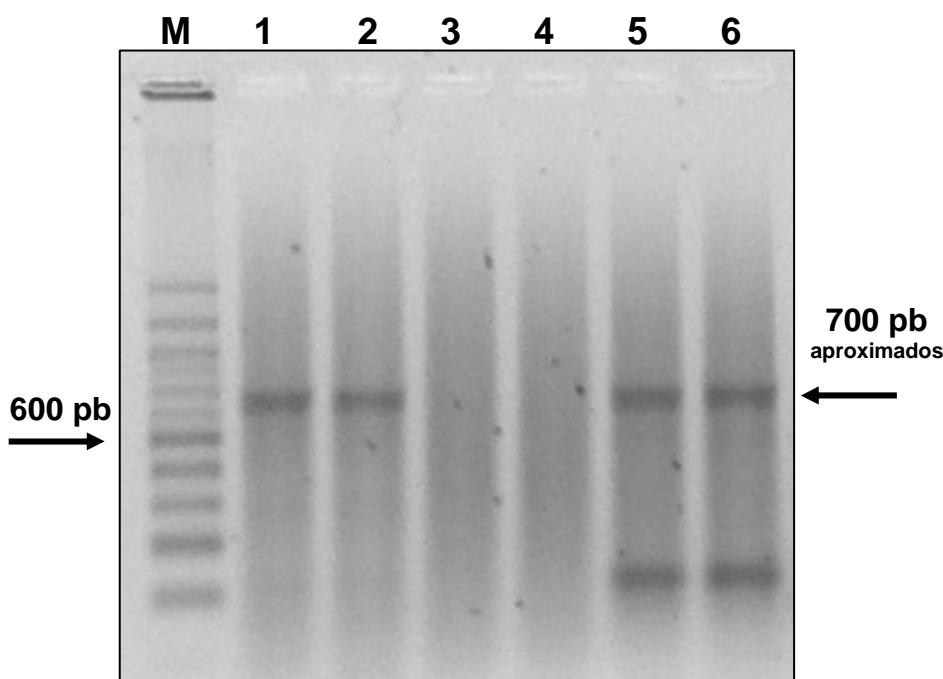


Figura 07 - Resultado de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídio, dos produtos da amplificação por semi-nested RT-PCR, utilizando *primers* descritos por Maliogka *et al.* (2004). Amplificação da região conservada do RNA1 de vírus da família Secoviridae. **(M)** - marcador molecular 100pb; **1 e 2** – *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) isolado de feijoeiro; **3 e 4** - controle negativo (planta sadia); **5 e 6** - BRMV isolado de soja.

Os materiais de BRMV amplificados foram purificados, sequenciados e clonados. Uma vez obtidas sequências de nucleotídeos de qualidade, estas

foram comparadas com as sequências depositadas no banco público (GenBank).

Sequências com alto grau de similaridade foram reunidas, formando um pequeno *contig* de aproximadamente 300 nucleotídeos, que quando comparado com sequências depositadas no GenBank, apresentando 78% de similaridade com a sequência da poliproteína 1 do BPMV, gênero *Comovirus*, descrita por Gu e Ghabrial (2005).

Considerando que o BRMV até o momento não foi completamente sequenciado e que apenas uma sequência parcial do RNA2 do mesmo encontra-se depositada no GenBank (Souto *et al.*, 2002), as semelhanças das sequências dos fragmentos de RNA1 dos isolados virais de feijoeiro e soja, com sequência de outros comovirus depositadas no GenBank, sugerem que estas sequências devem pertencer à espécie BRMV. A proximidade do BRMV com outros comovirus, tais como o CPSMV e BPMV foram anteriormente relatadas por Gámez (1972) e Bruening (1978).

Vale ressaltar que os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados com base em uma região conservada da sequência do RNA 1 de 17 Secoviridae, dentre estes do próprio BPMV. Entretanto, quando foram realizadas reações de PCR com *primers* específicos para BPMV (GU *et al.*, 2002), nenhum dos materiais correspondentes aos isolados de soja e feijão foi amplificado. Este resultado, somado aos resultados dos testes Elisa, comprova que os isolados em estudo de fato pertencem ao gênero *Comovirus*; resultados idênticos foram encontrados após a realização de novas reações de semi-nested RT-PCR, assim como nas etapas posteriores necessárias para o sequenciamento.

Nas reações de PCR inicial foram utilizados os *primers* ComF1 + ComR2, o produto desta reação foi utilizado nas reações posteriores de semi-nested RT-PCR com os *primers* ComNeF3 + ComNeR4 + ComNeR5, conforme sugerido por Maliogka *et al.* (2004). Levando-se em consideração que estes são *primers* degenerados, passaram, então, a serem combinados nas reações subsequentes de semi-nested RT-PCR, conforme segue:

⇒ 1º) ComF1 + ComNeR4;

⇒ 2º) ComF1 + ComNeR5;

⇒ 3º) ComNeF3 + ComR2

Estas combinações foram utilizadas em reações separadas de semi-nested RT-PCR, nas mesmas condições que vinham sendo realizadas anteriormente, resultando em ampliações diferentes daquelas encontradas inicialmente (Figura 08).

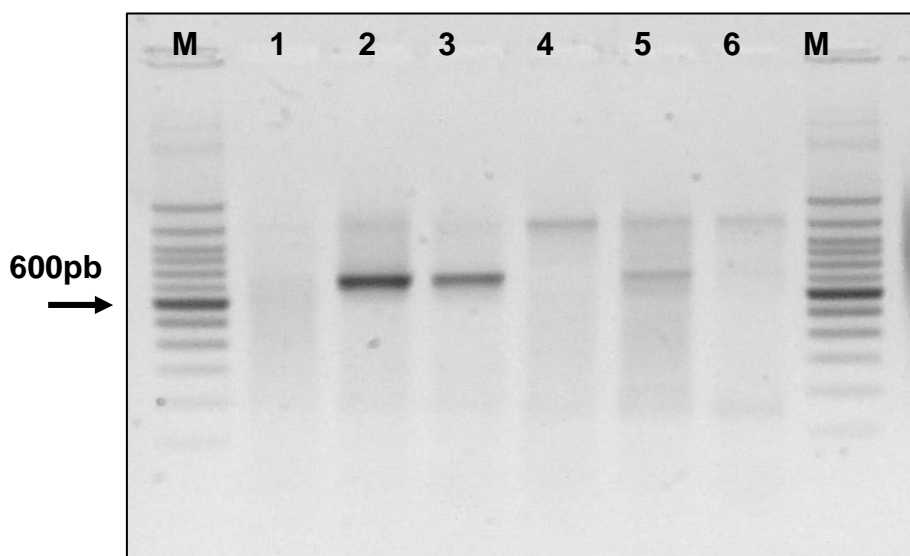


Figura 08 - Resultados de eletroforese em gel de agarose dos produtos da amplificação por semi-nested RT-PCR utilizando *primers* descritos por Maliogka *et al.* (2004) em diferentes combinações. **(M)** - marcador molecular 100pb; **1**- isolado de feijoeiro com os *primers* ComF1 + ComNeR4; **2** - isolado de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) de feijoeiro com os *primers* ComF1 + ComNeR5; **3** - isolado de BRMV de feijoeiro com os *primers* ComNeF3 + ComR2; **4** - isolado de BRMV de soja com os *primers* ComF1 + ComNeR4; **5** - isolado de BRMV de soja com os *primers* ComF1 + ComNeR5; **6** - isolado de BRMV de soja com os *primers* ComNeF3 + ComR2.

As ampliações encontradas foram de aproximadamente 740 pb chegando algumas a mais de 1000 pb. Após o sequenciamento, foi observado que os materiais apresentavam similaridade com o RNA1 dos *Comovirus*. O alinhamento e a combinação destas sequências revelaram grande semelhança entre elas, facilitando a construção de um *contig* de aproximadamente 756 nucleotídeos.

A sequência de nucleotídeos obtida, quando comparada com sequências de vírus do GenBank, apresentou elevada similaridade com sequências do RNA1 de RaMV e BPMV, apresentando identidade de 71% e 69%, respectivamente. Desta forma confirmou-se que os produtos de semi-nested RT-PCR amplificados correspondem a uma região genômica do BRMV que, até o presente momento, não havia sido relatada (Figura 09 e Figura 10).

O *contig* de 756n obtido neste trabalho corresponde à região de domínio conservado da RdRp do RNA1 do BRMV, pois os *primers* utilizados permitem amplificar esta região conservada do RNA1 dos vírus da família Secoviridae, segundo Maliogka *et al.* (2004).

Esta sequência foi depositada no GenBank, sob o número de acesso *GU205154* ou *gi|284807373|*. Através da respectiva tradução em aminoácidos foi possível confirmar a presença das regiões conservadas em comovírus, (S/W)**EG**(Y/F)**P**; **GK** e (T/Y)**YGDDN**(V/L), utilizados por Maliogka *et al.* (2004) como base para a construção dos *primers* (Figura 11).


```

>gb|AY744931.1| Bean pod mottle virus subgroup I segment RNA1, complete sequence
Length=5998

Score = 273 bits (302), Expect = 8e-70
Identities = 483/694 (69%), Gaps = 10/694 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 63 GGTGCCTTA-CTCGAGCGCATCAAAGATTGTAACTGTACCGTATGAGCATCTCATTGAA 121
|| ||||| || || |||| || || |||| || || |||| |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4905 GGAGCCTTAGCTTGA-CGCAACAACTTTTATACTATATCTGATAAGCATCTCATTGAA 4847

Query 122 GATACTGTTACAAATAACTGTCTAGAGGGAAACCAGAAGGAATACCACACTCGACTTTCCA 181
|| ||||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4846 AATGCTATTACAGATAACAGTGAAGTGGAAATCCAGAAGGGATACCACACTCAACTCTCCA 4787

Query 182 CACAGAGCCTCTACATATGGCATATCGCGAACAACAAGCCAAAAAGTAAATTCCTCTCGTTC 241
||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4786 AACATTTTTTTTACAGATTGCCATCCTGGAGCAACAAGCTAACAGAAGATGTGTTCTCTC 4727

Query 242 CCTACAT-AGTTTCGGTCCACCGCCACACAGCTTGTTAATCATGGCAGCCATAACTTGC- 299
| ||| ||||| || || ||||| || |||| ||||| | ||||| |||||
Sbjct 4726 ACG-CATCAGTTTCTCATCTCCACCACAAAAGACTGTTTATCATTCTGCCAT--CTTGCT 4670

Query 300 -ATCACCTGTTTGGTTAACAGACCATCAAACACTACTGTAGTCACAACACAGTATGTTGTT 358
|| || || || |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4669 CATAACTTGCCTTAGTTATCAGACCATCAAACACTAGCATAGTCACAACACAAAATGTCATT 4610

Query 359 ACCTTTTTCCCTCAGCCTATGTGCTAGATCAGTCCATTCACTACTGTAGGGATTAATACC 418
|| || | ||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4609 TCCCTTGCTCAACAGTCTATTTGCCAAACCAGTCCACTCCATAGAATATGGATTGATTCC 4550

Query 419 CACCTGGCAAGGCAGCTTACTCCTATTGCGCATTATGAAACGCACAAAAGTGAGAAACTT 478
|| ||||| || || ||||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4549 AACCTGGCAACTCAATTTGTCCTTTTCTTCATAATGAATCGCACAAAATTCAGAAATTT 4490

Query 479 CTGCCGAACAATGAGATTATATCCATTGGCAGTATTGTGAAACACCTTGTTTTGGGCTT 538
|| || || | |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4489 TTGACGCACCCTAGATTAAATTCATAGAAAGTATGGTGAAGCAGCGCTCTTGGGTTT 4430

Query 539 GGTGAAAACCTTTCCTTAATGGCAATTTTTTCATCTTTGGGGCAITCAATGCCAACCAAGTGT 598
||| ||| | ||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4429 ATCAAAAATTTGCGACGGGGAAGTTTTTCATCTTTGGGACAITCTATGCCAACCAATGT 4370

Query 599 GGGAGGACCCATTTCCAATGTTTTAATCATCTCATCATATGCAATTTGCACACTCGTACC 658
||| || | |||| || || ||| || || |||| || |||| |||| ||||
Sbjct 4369 TGGAACACACTTTTCTAGTTCAACAGTCAATTTATTGTATGCTTCTTCAACACTGGTACC 4310

Query 659 AGGCACTAACTCAAAAAGT-TTCACCATCACCTTGTACAAATCTTTTCTTTCTCTCTC 717
||| | | | | |||| |||| || |||| |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4309 AGG-AAATTAGTGACATTTCTTCCACCATCTCCAGTGACAAATCTTCTCTTGCCTTTTTCAC 4251

Query 718 CAGCTGTTCTTGACAGTACATGTGGAACCCCTC 751
|| | | | |||| |||| |||| ||||
Sbjct 4250 CATTTTTCTTGACAGAACATGAGGAAAACCCCTC 4217

```

Figura 10 - Alinhamento da sequência correspondente a RdRp de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV), com a sequência do RNA1 do *Bean pod mottle*. A análise comparativa revelou similaridade de 69% entre os vírus. Alinhamento realizado em 11 de janeiro de 2010.


```

cgtgggaggggtttccacatgtactgtcaagaacagctggagagaaaggaaagaaaagat
  W E G F P H V L S R T A G E K G K K R F      20
  ttgtacaaggtgatgggtgaaacttttgagttagtgacctggtacgagtggtgcaaattgcat
  V Q G D G E T F E L V P G T S V Q I A Y      40
atgatgagatgattaaaacattggaaatgggtcctcccacacttggtggcattgaatgcc
  D E M I K T L E M G P P T L V G I E C P      60
ccaaagatgaaaaattgccattaaggaaagttttcaccaagccaaaacaaggtgtttca
  K D E K L P L R K V F T K P K T R C F T      80
caatactgccaatggaatataatctcattgttcggcagaagtttctcacttttgtgcggt
  I L P M E Y N L I V R Q K F L T F V R F     100
tcataatgcgcaataggagtaagctgccttgccaggtgggtattaatccctacagtaatg
  I M R N R S K L P C Q V G I N P Y S N E     120
aatggactgatctagcacataggctgagggaaaaaggtaacaacatactgtgttggtgact
  W T D L A H R L R E K G N N I L C C D Y     140
acagtagttttgatgggtctgttaaccaaacaggtgatgcaagttatggctgccatgatta
  S S F D G L L T K Q V M Q V M A A M I N     160
acaagctgtgtggcggtggaccgaaactatgtagggaacgagagaatttacttttggtt
  K L C G G G P K L C R E R E N L L L A C     180
gttgttcgcgatatgccatattgtagaggctctgtgtggaaagtcgagtggtgattcctt
  C S R Y A I C R G S V W K V E C G I P S     200
ctggtttccctctgacagttatttgtaacagtatcttcaatgagatgctcatacggtaaca
  G F P L T V I C N S I F N E M L I R Y S     220
gttacaaatctttgatgctgctcgagtaaggcaccatcaatcttcactggaaattttgaga
  Y K S L M R S S K A P S I F T G N F E K     240
aattggctcactctggttacctacggcgacgacaac
  L V T L V T Y G D D N                        251

```

Figura 11 - Resultado do sequenciamento dos produtos de semi-nested RT-PCR. Sequência de 756 nucleotídeos e a respectiva tradução em aminoácidos da região interna conservada codificadora RdRp do RNA1 do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). Em destaque as sequências de aminoácidos conservada entre os comovírus, (S/W)**EG(Y/F)P**; **GK** e (T/Y)**YGDDN(V/L)**, utilizadas na construção dos *primers* descritos por Maliogka *et al.* (2004).

Foi possível confirmar que a sequência de nucleotídeos obtida neste estudo corresponde a RdRp do RNA1 do BRMV, pois a análise comparativa do alinhamento desta sequência com o domínio conservado da RdRp presente no GenBank (Cdd/cd01699) indicou alta similaridade entre estas, confirmada com o E-value 2e-52. Durante o alinhamento foi possível observar a similaridade de alguns aminoácidos conservados e a presença do *motifs* VI **GDD**, relatado por Koonin (1991), confirmando que a sequência de nucleotídeos encontrada neste estudo corresponde a região interna e conservada do domínio da RNA polimerase do RNA1 do BRMV (Figura 12).

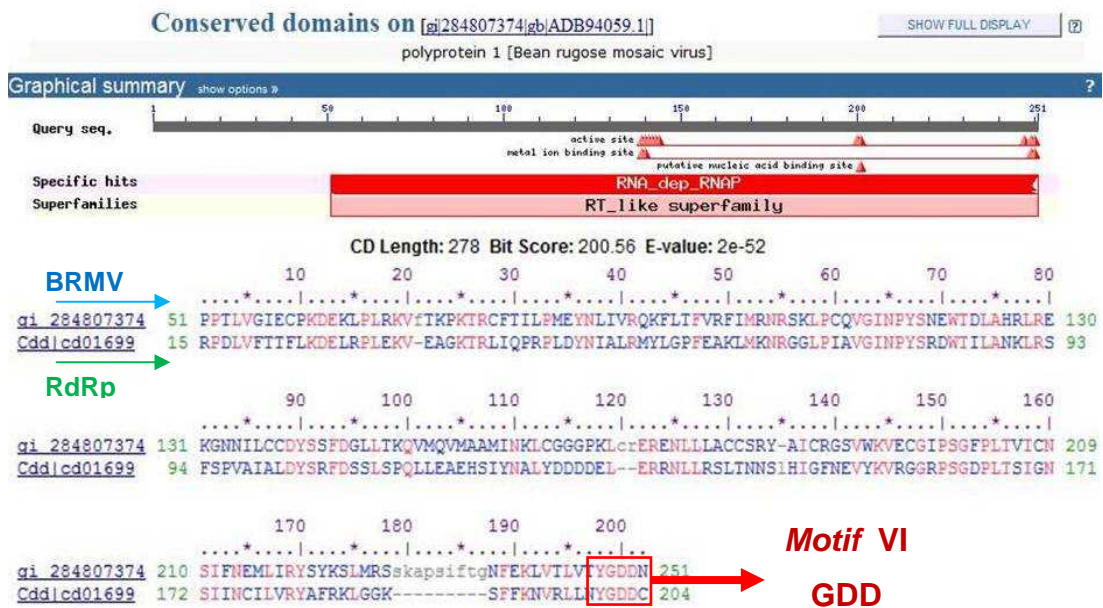


Figura 12 - Resultado do alinhamento da sequência traduzida do fragmento de 756pb do gene codificador da RNA polimerase do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) com a sequência do domínio conservado da RdRp (Cdd/cd01699), indica a alta similaridade entre as sequências. Em destaque o *motifs* VI GDD, região conservada em todos os vírus de RNA senso positivo (KONNIN, 1991).

O alinhamento da sequência parcial da RNA polimerase do BRMV, através do método *neighbor-joining* com as sequências completas do RNA1, disponíveis no GenBank, dos Secoviridae: APMoV (gi/586232/); SqMV (gi/81963673/); RaMV (gi/213972515/); TuRSV (gi|260876006|); CPSMV (gi/549316/); BPMV (gi/81951160/); CPMV (gi/138362/); (gi/549317/); *Broad bean wilt virus 1 - BBWV-1* (gi/38044071/); *Broad bean wilt virus - BBWV-ME* (gi/81980609/); *Broad bean wilt virus 2 - BBWV-2* (gi/81980609/); *Patchouli mild mosaic virus - PatMMV* (gi/81997058/); *Blackcurrant reversion-associated virus - BRAV* (gi/50400782/); *Peach rosette mosaic virus - PRMV* (gi/81920792/); *Grapevine fanleaf virus - GFLV* (gi/130392/); TRSV (gi/50401020/); *Cycas necrotic stunt virus - CNSV* (gi/50400776/); *Tomato black ring virus - TBRV* (gi/51316452/); *Grapevine chrome mosaic virus – GCMV* (gi/130391/), permitiu após análise em “bootstrap” (1000/ensaios) gerar a seguinte árvore filogenética (Figura 13).

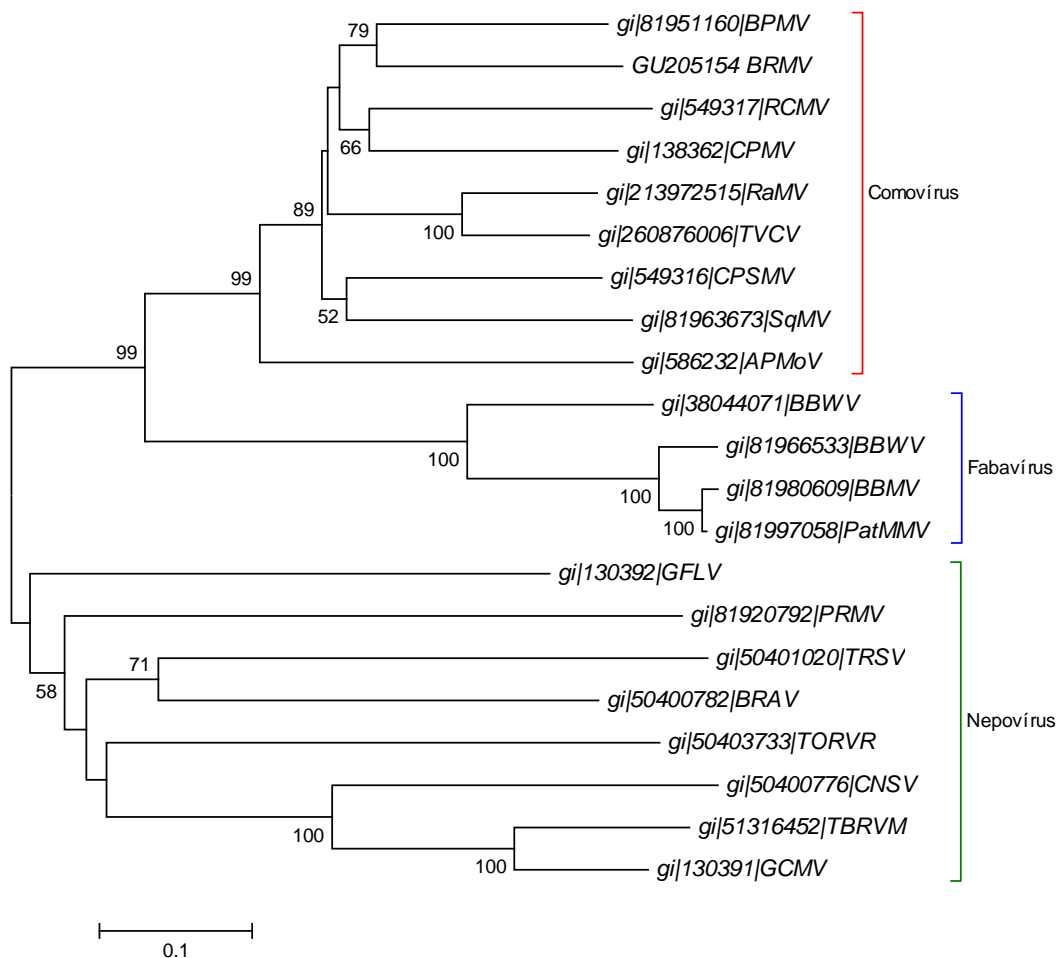


Figura 13 - Resultado do alinhamento da região conservada da RNA polimerase do BRMV (*GU205154*) com as sequências completas do RNA1 dos Secoviridae: *Andean potato mottle virus* - APMoV (*gi|586232/*); *Squash mosaic virus* - SqMV (*gi|81963673/*); *Radish mosaic virus* – RaMV (*gi|213972515/*); *Turnip ringspot virus* – TuRSV (*gi|260876006/*); *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (*gi|549316/*); *Bean pod mottle virus* - BPMV (*gi|81951160/*); *Cowpea mosaic virus* - CPMV (*gi|138362/*); *Red clover mottle virus* - RCMV (*gi|549317/*); *Broad bean wilt virus 1* - BBWV-1 (*gi|38044071/*); *Broad bean wilt virus* - BBWV-ME (*gi|81980609/*); *Broad bean wilt virus 2* - BBWV-2 (*gi|81980609/*); *Patchouli mild mosaic virus* - PatMMV (*gi|81997058/*); *Blackcurrant reversion-associated virus* - BRAV (*gi|50400782/*); *Peach rosette mosaic virus* - PRMV (*gi|81920792/*); *Grapevine fanleaf virus* - GFLV (*gi|130392/*); *Tobacco ringspot virus* - TRSV (*gi|50401020/*); *Cycas necrotic stunt virus* - CNSV (*gi|50400776/*); *Tomato black ring virus* - TBRV (*gi|51316452/*); *Grapevine chrome mosaic virus* – GCMV (*gi|130391/*).

A árvore filogenética construída com o alinhamento da sequência parcial do RNA1 dos isolados de BRMV e as sequências completas dos RNA1 de 21 membros da família Secoviridae, permitiu o agrupamento em três grupos distintos de acordo com os respectivos gêneros, dos quais 9 foram agrupados no gênero *Comovirus*, 4 no gênero *Fabavirus* e 8 no gênero *Nepovirus*.

O fato do processo de replicação dos vírus de RNA ser dependente da eficiente produção da RNA polimerase (RdRp) pela célula hospedeira, faz com que esta região genômica não sofra modificações na sua sequência, sendo então muito conservada no genoma das diferentes espécies de um mesmo gênero de vírus, assim como é observado nos *Comovirus* (KOONIN e DOLJA, 1993).

A RdRp, codificada pelo RNA1, é a região mais conservada nos *Comovirus*, sendo por essa razão utilizada como critério de diferenciação entre os membros deste gênero. A análise filogenética baseada na sequência da RdRp codificada pelo RNA1 do BRMV permitiu agrupá-lo como um *Comovirus* muito próximo ao BPMV, como já relatado por Gámez (1972).

O isolado de BRMV pode ser agrupado no gênero *Comovirus*, apresentando similaridade de 79% com o BPMV, permitindo o seu agrupamento entre os demais comovírus que infectam leguminosas (BPMV, CPMV, CPSMV e RCMV), como anteriormente observado por Komatsu *et al.* (2007), que no estudo dessa região genômica, separou os *Comovirus* que infectam exclusivamente hospedeiras leguminosas dos demais membros do gênero que infectam outras hospedeiras não-leguminosas.

Com base no estudo dessa mesma região genômica, o RaMV e o TuRSV apresentaram alta similaridade entre si, podendo haver uma possível correlação entre eles pelo fato de infectarem crucíferas. Todavia, o CPSMV e o SqMV mostraram-se intimamente relacionados, embora o SqMV infecte cucurbitáceas. Já o APMoV apresenta-se distantemente relacionado dos demais *Comovirus*, também notado por KOMATSU *et al.* (2007).

Os *primers* degenerados de Maliogka *et al.* (2004) são filogeneticamente informativos para a identificação e classificação de membros da família Secoviridae e possivelmente de outras espécies de vírus de plantas

de genoma bipartido semelhantes aos *Picornavirales*, permitindo a obtenção de informações genômicas da região terminal do RNA1, a qual poderá ser sequenciada, como foi realizado neste trabalho, servindo posteriormente como ponto de partida para o sequenciamento completo do vírus.

Vale ressaltar que estes *primers* haviam sido utilizados na amplificação por semi-nested RT-PCR de *Comovirus* que infectam hospedeiras não-leguminosas, e neste trabalho pode ser demonstrada também a sua eficiência para amplificação genômica do BRMV do feijoeiro e soja.

O alinhamento global da sequência de aminoácidos correspondente ao domínio RdRp do RNA1 do BRMV e as sequências completas do RNA1 dos Secoviridae APMoV, SqMV, RaMV, TuRSV, CPSMV, BPMV, CPMV, RCMV, BBWV-1, BBWV-ME, BBWV-2, PatMMV, BRAV, PRMV, GFLV, TRSV, CNSV, TBRV e GCMV, mostrou a grande similaridade entre estes vírus, confirmando que a sequência codificadora da RdRp fornece base para estudos filogenéticos de vírus RNA senso positivo, como já relado por Koonin (1991) (Figura 14 A a F).

A

```

gi|51316452|TBRMV
gi|130391|GCMV
gi|50400776|CNSV
gi|50400782|BRAV
gi|50403733|ToRVR
gi|130392|GFLV
gi|50401020|TRSVB
gi|81920792|PRMV
gi|549316|CPSMV
gi|81951160|BPMV
gi|284807374|BRMV
gi|213972515|RaMV
gi|260876006|TVCV
gi|138362|CPMV
gi|549317|RCMV
gi|81963673|SqMV
gi|586232|APMoV
gi|81980609|BBWV2
gi|81997058|PMMV
gi|81966533|sp|Q997D0|BBWV-ME
gi|38044071|BBWV-1

```

```

          GYP          KGK
          F            S
NFVMTSPGYPFYFKNNRAEKLGKGHAYFEAEEDGS-----LQLKKGMA 1618
NFVMTSPGYPFYFKNK--GLGKGGKHPYFEEDGS-----LKLKEGSA 1600
CLKMRTSPGYPFVYLHK-EPGKMGKEAYFELAPDGT-----RALKEGSLA 1676
-FNLQSSSEGYPYVTQR-KPGESGKIRFFEMDPYTG-----LKSILPNTLP 1558
-VVKGTSSEGYPFVLSR-RPGEKGGKARFLEELEPQPGDTKPKYKLVVGTVEV 1668
-LVMDTSEGYPDVLDLDR-KPGEKGGKARFFVGEPEGNR-----AFVAGCNPEK 1634
-LIMDTSEGYPYVLER-THGEKGGKIRYFEGGPGAY-----TLKPGTSTVYN 1665
PMKLDTSEGYPHCVRR-GPGEKGGKRRFVEIDDDFH-----FSLKPDITDV 1612
RVPMATSEGFPHILSR-KSGEKGGKGRFVYGDGEIFD-----LIPGTSV 1322
RIPLATSEGFPHVLSR-KNGEKGGKRRFVSGDGEEMT-----LIPGTSV 1318
-----WEGFPHVLSR-TAGEKGGKRRFVQGDGETFE-----LVPGTSV 36
RIPLATSEGFPHILSR-ANGEKGGKIRFVEGDSEEMM-----LIPGTSV 1324
RIPMATSEGFPHILSR-SHGEKGGKIRFVEGDGEDLT-----LLPNTSV 1323
RIPLATSEGFPHILSR-NGEKGGKRRFVQDDCVVS-----LIPGTTV 1332
RIPLATSEGFPHVMSR-EQGEKGGKRRFVQGDGHVVS-----LIPGTSV 1329
RIPLATSEGFPHILSR-EMGEKGGKRRFVETVGGKCA-----LIEGTSV 1325
CIPKTSSEGFPHVLSR-APGEKGGKRRFLEGDGEKFS-----LREGTSV 202
ALVLTSEGFPHYRLDR-GPGDKGKSRVVSSESGLK-----ITDEG-V 1348
ALVLTSEGFPHYRLDR-GPGDKGKSRVVSSESGLK-----ITDEG-V 1348
ALVLTSEGFPHYRLDR-GPGEKGGKSRVVSSESGLK-----ITDEG-V 1347
ALVLTSEGFPHYRLDR-KPGEKGGKARVVEGEPGNLE-----ITDER-I 1320
          *: *           . ** : .

```

B

```

gi|51316452|TBRMV
gi|130391|GCMV
gi|50400776|CNSV
gi|50400782|BRAV
gi|50403733|ToRVR
gi|130392|GFLV
gi|50401020|TRSVB
gi|81920792|PRMV
gi|549316|CPSMV
gi|81951160|BPMV
gi|284807374|BRMV
gi|213972515|RaMV
gi|260876006|TVCV
gi|138362|CPMV
gi|549317|RCMV
gi|81963673|SqMV
gi|586232|APMoV
gi|81980609|BBWV2
gi|81997058|PMMV
gi|81966533|sp|Q997D0|BBWV-ME
gi|38044071|BBWV-1

```

```

          P            KDE L            R F
AELHENLVEFTKNEVPELVVIECTKDE-LLPERKIKVGACRLFEIMPLHY 1667
AELYENMAQFAKEEVEPELVVIECPKDE-LLPARKIKVGPCLRFIEIMPLHY 1649
AELYENIVQYSKSAIPELVVIECPKDE-LLKTEKVNK-ACRPFIEIMPLHY 1724
AMRYEALQRDCFTSVPEMVCIEPKDECLPLRKICIKPKTRLSFILPLEF 1608
HSAMVAMEQQARTEVPLLIGMDVVPKDERLKPSKVLEKPKTRTFVVLPMHY 1718
AYYQLEEDSKTK--IPSLVSIETPKDERLKRSKI DTIPG-TRLSFVLPPLAY 1681
DYHKLQEEVQVEGGIPEMVCIECPKDELLVERKVLQKLGTRNFEILELPK 1715
FKNYQALSGTISQQVPELVNCECLKDECLKRRK---VATPRLFDVMPFEH 1659
HEAYLTLEETCADIVPALVGI ECPKDEKLPRLKIYEKPKTRCFIVLPMHY 1372
EEAYNKLIVELEKSVPTLVGIECPKDEKLPRLKIFDKPKTRCFITILPMEF 1368
QIAYDEMIKILEMGPPTLVGIECPKDEKLPRLKVFETPKPKTRCFITILPMEY 86
SEALDIMEAQLENEVPTLIGIECPKDEKLPRLKIFEKPKTRCFISILPMEY 1374
TEALDIMEEHLHEVPTLIGIECPKDEKLPYRKIFEKPKTRCFISILPMEY 1373
AKAYEELEASAHRFVPALVGI ECPKDEKLPRLKIFEKPKTRCFITILPMEY 1382
HEAYETLSRTIATEVPTLVGIECPKDEKLPRLKVFETPKPKTRNFTILPMEY 1379
YHAFEILQEQQKMEVPTLIGIECPKDEKLPRLKIYDTPKPKTRCFITILPMEY 1375
KKAYDLLQEEIDRSVPTLVVAIECPKDEKLPRLKIYTSPKPKTRCFISILPMEY 252
LSDIAWFEEVSKTIQVPDLYCIECVKDERLPKRVLHEPKSRLFTVLPMYSY 1398
LSDIAWFEEVSKTIQVPDLYCIECVKDERLPKRVLHEPKSRLFTVLPMYSY 1398
LSDINWFEEVSKTIQVPDLYCIECVKDERLPKRVLHEPKSRLFTVLPMYSY 1397
LADIHWFEI SKTIQVPDLYCIECVKDERLPVRKVIKEPKSRLFTVLPMYSY 1370
          * : : : * * * * . * * : : :

```

C

```

gi|51316452|TBRMV
gi|130391|GCMV
gi|50400776|CNSV
gi|50400782|BRAV
gi|50403733|ToRVR
gi|130392|GFLV
gi|50401020|TRSVB
gi|81920792|PRMV
gi|549316|CPSMV
gi|81951160|BPMV
gi|284807374|BRMV
gi|213972515|RaMV
gi|260876006|TVCV
gi|138362|CPMV
gi|549317|RCMV
gi|81963673|SqMV
gi|586232|APMoV
gi|81980609|BBWV2
gi|81997058|PMMV
gi|81966533|sp|Q997D0|BBWV-ME
gi|38044071|BBWV-1

```

```

      N R          R L V G      W
NLFLRQKTC1CAFTQ2FLQHN3RHLPC4QVGIN5PYSRE6WGH7MLN8RLMR9PKTNEA 1717
NLLLRVKTCAFTAF10LQHN11RHLPC12QVGIN13PYSRE14WGH15LLN16RLRVK17TNEA 1699
NLFLREKTLAFSL18FQQNR19RHKLAC20QVGT21KAYSH22DWTH23MYQRL24VAKSD-RA 1773
NLLLRKKFLHFSS25SLQ26MHRD27ILPT28QVGN29PYSRE30WGE31LLQRL32RAQSS-VA 1657
NLLLRKYVGI33LCSS34MQVNR35RHLAC36AVGIN37PYSRD38WTDI39YQRL40AEKNS-VA 1767
NLLLRVKFLS41FSR42LLM43KKR44GH45LPC46QVGIN47PYSRE48WTD49LYH50RLG51ELSD-VG 1730
NMLFRKKFLH52WAL53FLSD54MRW55CLPC56QVGI57VVQ58GRE59WGL60MD61RLA62AKNS-VA 1764
NILLREY63FLN64FSAFI65QAN66RI67YLS68AC69VG70TNP71YSRE72WTT73LYD74RLAE75YSD-TG 1708
NLVVR76RRK77FL78K79V80VF81IM82KN83R84H85RL86SC87QVGIN88PY89GME90WS91RLA92MS93LL94E95KG96N-NI 1421
NLVVR97Q98K99FL100N101F102VR103F104IM105KK106RD107VL108PC109QVGIN110PYSME111WT112GLAN113RL114LS115KG116N-DI 1417
NLIVR117Q118K119FL120T121F122VR123F124IM125NR126SK127LPC128QVGIN129PYSNE130WTD131LA132H133RL134E135KG136N-NI 135
NLLVRRR137FL138T139F140VR141F142IM143NR144N145VL146PC147QVGIN148PY149GME150WTD151LAM152RL153KR154KG155N-NI 1423
NLLVRRR156FL157K158VR159F160IM161KRR162DIL163PC164QVGIN165PY166GME167WTD168LAAR169LK170SK171GN-NV 1422
NLVVR172RRK173FL174N175F176VR177F178IM179AN180R181H182RL183SC184QVGIN185PYSME186WS187RLA188ARM189KE190KG191N-DV 1431
NILVR192Q193Y194FL195N196F197VR198F199IM200KK201RD202VL203PC204QVGIN205PYSME206WS207IVAS208RL209LK210Q211GN-DI 1428
NLLVR212M213K214FL215K216VR217F218IM219NR220E221KLAC222QVGIN223PYSME224WTR225LAG226SLL227SV228GQ-NI 1424
NLLVR229Q230K231FL232H233F234VR235F236IM237KRR238D239VL240PC241QVGN242PYSLE243WGA244IAR245RL246Q247EV248GN-SI 301
NIVIR249KK250FL251N252F253VR254F255IM256KRR257D258VL259TA260QVGIN261PYSRE262WTR263MANK264L265LS266KG267N-NI 1447
NIVIR268KK269FL270N271F272VR273F274IM275KRR276D277VL278PA279QVGIN280PYSRE281WTR282MANK283L284LS285KG286N-NI 1447
NIAIR287KK288FL289N290F291VR292F293IM294KRR295D296VL297PA298QVGN299PYSRE300WTR301IANK302L303LS304KG305N-NV 1446
NLAIR306KK307FL308N309F310VR311F312IM313KRR314D315VL316PC317QVGIN318PYSR319Q320WG321K322VAD323RL324LE325KG326N-SI 1419
*: . *          * * . ** . : * : :

```

D

```

gi|51316452|TBRMV
gi|130391|GCMV
gi|50400776|CNSV
gi|50400782|BRAV
gi|50403733|ToRVR
gi|130392|GFLV
gi|50401020|TRSVB
gi|81920792|PRMV
gi|549316|CPSMV
gi|81951160|BPMV
gi|284807374|BRMV
gi|213972515|RaMV
gi|260876006|TVCV
gi|138362|CPMV
gi|549317|RCMV
gi|81963673|SqMV
gi|586232|APMoV
gi|81980609|BBWV2
gi|81997058|PMMV
gi|81966533|sp|Q997D0|BBWV-ME
gi|38044071|BBWV-1

```

```

      CDY  FDGLL
      FM
INCDYSG1FDGLLN2PQL3IECIARMIN4RLYL5ALSGES6DV7QQ8AQR----- 1758
INCDYSG9FDGLL10T11PQL12VE13MA14ARMIN15RLYL16RS17GES18EV19MQAQR----- 1740
INCDYSS20FDGLLN21SQ22VV23SCIAN24MIN25SMY26H27SP28EET29VV30SK31RQR----- 1814
INCDYAS32FDGLLT33GQ34ILE35KI36GT37MIN38KMY39IG40SE41ASKI42QRLN----- 1697
LNCDYSR43FDGLLN44YQ45AV46VH47IV48N49FINK50LYN--DEHSIV51VRGN----- 1805
YNCDYK52AFDGLITE53QIL54STIAD55MINAG56YR57DPV58GNR59QRK----- 1768
YNCDYSK60FDGLMSC61QVLD62AI63G64Q65V66NK67CYS68NAN69P70NL71KK72K73G74KG75EL76PG77SP78Q79L 1814
LNCDYSK80FDGLISH81QIS82R83GW84LQ85P86ST87V88FLE89TV90RR91QIL92RVGN----- 1748
LCCDYSS93FDGLLT94K95Q96M97H98L99M100SE101MIN102EL103CGG104SS105RL106K107Q108RTN----- 1461
LCCDYAS109FDGLIT110K111Q112VM113SK114MA115E116MIN117SL118CGG119DE120K121IM122R123ERTH----- 1457
LCCDYSS124FDGLLT125K126Q127VM128Q129VMA130AM131INK132LCGG133G134PK135LCRE136REN----- 175
LCCDYSS137FDGLLSK138Q139VM140K141AMS142DM143IN144N145FCGG146NE147SS148K149KR150REH----- 1463
LCCDYSS151FDGLLSK152Q153VM154TAM155AS156MIN157FCGG158DT159SI160KK161REN----- 1462
LCCDYSS162FDGLLSK163Q164VM165D166VIA167S168MIN169EL170CGG171ED172QL173KN174ARRN----- 1471
LCCDYSS175FDGLLSK176Q177IM178EM179MAD180MIN181RF182CGG183GT184LICA185K186REN----- 1468
LCCDYK187S188FDGLLSK189Q190VM191T192VIA193T194MIN195RL196CGG197S198Q199ES200Q201T202MR203MN----- 1464
LCCDYSS204FDGLMS205Q206VMS207CIAD208T209M210N211DF212MGG213D214V215L216K217R218Q219R220KN----- 341
LCCDYSR221FDG222FL223PK224IM225NEI226GN227MIAR228LM229KT230DEV231S232RT233Q234IKN----- 1487
LCCDYSR235FDG236FL237PK238IM239NEI240GN241MIAR242LM243RV244DEV245S246RT247Q248IKN----- 1487
LCCDYSR249FDG250FL251PK252CV253MNEI254GN255MIAR256V257MRAS258DES259RT260Q261IKN----- 1486
LCCDYSR262FDG263FL264PK265IM266V267KIA268EM269FS270NIV271GET272GA273RE274Q275IKN----- 1459
*** ***:

```


E

```
gi|51316452|TBRMV      --YNNMIALVGRYAFVGGQVYKVNCGLPSPGFALTIVVNSVFNELIRYAY 1806
gi|130391|GCMV        --LNMIMALCGRYALVGTQVYKVNCGLPSPGFALTIVVNSVFNELIRYAY 1788
gi|50400776|CNSV      --YNNMIALVGRYALVGTQVYKVNCGLPSPGFALTIVVNSVFNELIRYCF 1862
gi|50400782|BRAV      ----LLMSIVNRKISCGARVYEVVRAGLPSPGCALTIVLLNSIFNEFLIRVFW 1743
gi|50403733|ToRVR     ----LLMAMYGRWSVCGQRVFEVRAGMPSPGCALTIVIIINSLFNEMLIRYVY 1851
gi|130392|GFLV       ----NLLLAICGRLSICGNQVYATEAGIPSPGCALTIVVNSVFNELIRYCF 1815
gi|50401020|TRSVB     ARYNLLMSIFGRKCLARSQVFEVRGGIRR-GALTIVLLNSVFNELIRYVY 1863
gi|81920792|PRMV      ----LLMFIGRRSICGRQVYVVRGGMPSPGCALTIVVNSIFNEILIRYVY 1794
gi|549316|CPSMV      ----LLMACCSRYSALCKGEVWRVECGIPSPGFPLTVICNSIFNELLVRYSY 1507
gi|81951160|BPMV     ----LLLACCSRMAICKDVRVVECGIPSPGFPLTVICNSIFNEMILIRYSY 1503
gi|284807374|BRMV    ----LLLACCSRYAICRGSVWVVECGIPSPGFPLTVICNSIFNEMILIRYSY 221
gi|213972515|RaMV    ----LLMACCSRYAICKNTVWVVECGIPSPGFPLTVICNSIFNEILIRYSF 1509
gi|260876006|TVCV    ----LLMACCSRYAICKSDVWRVVECGIPSPGFPLTVICNSIFNEILIRYSF 1508
gi|138362|CPMV       ----LLMACCSRLAICKNTVWRVVECGIPSPGFPLTVIVNSIFNEILIRYHY 1517
gi|549317|RCMV       ----LLMACCSRRAISRDSVWRIECGIPSPGFPLTVICNSIFNEILVRYHY 1514
gi|81963673|SqMV     ----LLMACCSRYSIAIKNEVWRVVECGIPSPGFPLTVICNSIFNEILVRYCY 1510
gi|586232|APMoV      ----LLMACCSRFSVVKGNVWRVVEGGIPSPGFPLTVVNGIFNELLVRYCF 387
gi|81980609|BBWV2    ----LMLACTSRYAMCNRLVRYVENGIPSPGFPLTVIVNSILNEILVKYAY 1533
gi|81997058|PMMV     ----LMLACTSRYAMCNRLVRYVENGIPSPGFPLTVIVNSILNEILVKYAY 1533
gi|81966533|sp|Q997D0|BBWV-ME ----LMLACTSRYAMCNRLVRYVENGIPSPGFPLTVIVNSILNEILVKYAY 1532
gi|38044071|BBWV-1  ----LMLACCSRYAICGRVLYRVENGIPSPGFPLTVIVNSILNEILIKYAY 1505
::  .* .. : .* : .*** * : : : : :
```

F

```
gi|51316452|TBRMV      KKLAPAP----ERNRFGSTVCLLVYGDNDLISVSPSIASWFTGEAIRIT 1851
gi|130391|GCMV        KTLAFTP----EKNRFGINVCLLVYGDNDLISVSPAVASWFTGEAIRVT 1833
gi|50400776|CNSV      KVLVLGP----QRNSFSTYVTLVYGDNDLMSCTDKIAIYFNGETIKET 1907
gi|50400782|BRAV      RTTIITGV----PRERFSSQVYVTLIYGDNDLIAVHPDYLPHPFNGEIIRTR 1788
gi|50403733|ToRVR     RITVPRP----LVNRFKQEVCLIVYGDNDLISIKPDTMKYFNGEQIKTI 1896
gi|130392|GFLV       KKIIVFPV----YKECFDRCVVLIITYGDNDVFTVAQSVMQYFTGDALKMQ 1860
gi|50401020|TRSVB     KTVIPSP----EFNRFETFTVTLVYGDNDLIAVDFSMQKIFTEGEVVKKT 1908
gi|81920792|PRMV      RKVTPAP----ACNFFNKVRLMVYGDNDLLTIKEEVIPFFDGFVKRE 1839
gi|549316|CPSMV      IKICQARVPATITYGFSTFVKMVTYGDNDLLSVQSAITHVFDGTLKKEF 1557
gi|81951160|BPMV     EKLLRQAKAPSMFLQSFKNFVSLCVYGDNDLISVHEYVQPYFSGSKLKSF 1553
gi|284807374|BRMV    KSLMRSSKAPSIFTGNFVKLVTLVYGDNDL----- 251
gi|213972515|RaMV    KAILRSQKIPDMI SVSFD EYVSMVYGDNDLLSVNEVIKPYFDGKRLKEF 1559
gi|260876006|TVCV    KAIMRKQKVPGLISISFDKIVGMVYGDNDLLSVSEVVKPYFDGKRLKEF 1558
gi|138362|CPMV       KKLMBREQQAPELIMVQSFDKLIGLVTYGDNDLISVNAVVTIYFDGKRLKQS 1567
gi|549317|RCMV       KLLIQEHNAAPNVVQSFKNLISMVYGDNDLISVNAVVKPYFDGTLKQQA 1564
gi|81963673|SqMV     RKILEKKNVPRPLHVNFPMPVKLVTYGDNDLISVSHVVASVFNGRILKAE 1560
gi|586232|APMoV      KKIMREGGATPLECSAFDSYIRFVYVYGDNDLISVSPVHDKFNGKLLKEC 437
gi|81980609|BBWV2    WHCFEDN---PSVQSNFDAHVSVMVYGDNDLISVSDAISSRFDGNFLVVF 1580
gi|81997058|PMMV     WHCFEDN---PSVQSNFDAHVSVMVYGDNDLISVSDAISSKFDGSSFLVVF 1580
gi|81966533|sp|Q997D0|BBWV-ME WHCFADN---PTVQSNFDAHVSVMVYGDNDLISVSDAISSKFDGNFLVVF 1579
gi|38044071|BBWV-1  WKCFETE---SLIRDFHFDIYVAMVYGDNDLISVSEAISSKFNGNFLVNF 1552
* : : *****
```

Figura 14 - Resultado de múltiplos alinhamentos de seqüências de aminoácidos do domínio conservado da RNA polimerase (RdRp) de espécies dos gêneros *Comovirus*, *Nepovirus* e *Fabavirus*, utilizando o programa ClustalW2: (A a F) *Bean rugose mosaic virus* - BRMV (gi|284807373/); *Andean potato mottle virus* - APMoV (gi/586232/); *Squash mosaic virus* - SqMV (gi/81963673/); *Radish mosaic virus* – RaMV (gi/213972515/); *Turnip ringspot virus* – TuRSV (gi|260876006/); *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV (gi/549316/); *Bean pod mottle virus* - BPMV (gi/81951160/); *Cowpea mosaic virus* - CPMV (gi/138362/); *Red clover mottle virus* - RCMV (gi/549317/); *Broad bean wilt virus 1* - BBWV-1 (gi/38044071/); *Broad bean wilt virus* - BBWV-ME (gi/81980609/); *Broad bean wilt virus 2* - BBWV-2 (gi/81980609/); *Patchouli mild mosaic virus* - PatMMV (gi/81997058/); *Blackcurrant reversion-associated virus*

- BRAV (gi/50400782/); *Peach rosette mosaic virus* - PRMV (gi/81920792/); *Grapevine fanleaf virus* - GFLV (gi/130392/); *Tobacco ringspot virus* - TRSV (gi/50401020/); *Cycas necrotic stunt virus* - CNSV (gi/50400776/); *Tomato black ring virus* - TBRV (gi/51316452/); *Grapevine chrome mosaic virus* – GCMV (gi/130391/).

Nos múltiplos alinhamentos realizados com a sequência do domínio conservado da RNA polimerase do RNA1 do BRMV com as sequências completas do RNA1 de 21 espécies da família Secoviridae, foi possível detectar 37 aminoácidos conservados entre as sequências.

Na Figura 14, quadro A, são encontrados os *motifs* de aminoácidos **G (Y/F)P**; **GK** conservados em todas as sequências alinhadas. Estes aminoácidos foram destacados por Maliogka *et al.* (2004) por serem conservados e, portanto, utilizados na construção dos *primers* para a amplificação da região de domínio da RdRp do RNA1 da família Secoviridae.

A análise dos alinhamentos múltiplos permitiu identificar novos *motifs* de aminoácidos em todas as sequências. O *motif* I **KDE**, descrito por Koonin (1991), foi encontrado em todas as sequências (Figura 14, quadro B), inclusive no BRMV. Adicionalmente foi possível identificar as tríades **CDY** e **FDG(F/L)(L/M)** em todas as sequências alinhadas (Figura 14, quadro D). Estudos adicionais poderão apontar a função desses aminoácidos e se estas regiões apresentam valor taxonômico para a classificação de membros da família Secoviridae.

Na sequência do BRMV foi observada a presença do *motif* VI (**GDD**) (Figura 14, quadro F), presente na RNA polimerase de todos os vírus de RNA já estudados (Koonin, 1991).

Segundo Koonin (1991), Buck (1996), Hataya *et al.* (2000) e Karasev (2000), o estudo das sequências codificadoras das RNAs polimerases de diferentes vírus podem servir de base para revisões taxonômicas e filogenéticas dos vírus RNA senso positivo, e com isso, podem ser utilizadas na reconstrução evolutiva de determinados gêneros de vírus.

Os resultados do sequenciamento parcial do RNA1 do BRMV

apresentados neste trabalho comprovaram a presença de regiões conservadas da RNA polimerase dos *Comovirus*, confirmando a classificação do BRMV como tal. As informações obtidas auxiliarão futuros trabalhos de sequenciamento completo do vírus, uma vez que as informações obtidas com esta padronização puderam complementar as informações já disponíveis, favorecendo os estudos taxonômicos que utilizam sequências de regiões genômicas.

Diante da diversidade de vírus que afetam o feijoeiro, é imprescindível a identificação e caracterização das principais viroses que afetam esta cultura. Os resultados obtidos durante este estudo reforçam a afirmativa de que informações precisas sobre os vírus associados aos sintomas de mosaico no feijoeiro e na soja, bem como informações precisas sobre as cultivares mais susceptíveis, poderão contribuir para a adoção de medidas que possam contribuir para a maior produtividade dessas culturas no Estado do Paraná.

5 CONCLUSÕES

Os isolados virais de feijoeiro e soja são estirpes do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV).

O BRMV apresenta as regiões conservadas da RNA polimerase, codificada pelo RNA1 e de valor taxonômico para a classificação dos vírus da família Secoviridae.

A sequência da região 3' do RNA1 do BRMV encontra-se depositada no GenBank sob o código de acesso *GU205154* ou *gi|284807373*.

O sequenciamento completo do BRMV poderá contribuir para elucidar a posição taxonômica do BRMV como uma espécie distinta de *Comovirus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, O.; ALEGRÍA, A.; LASTRA, R. Some biological and physicochemical properties of *Bean rugose mosaic virus*. **Phytopathology**, v. 76, n. 11, p. 1182-1189. 1986.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. EUA, Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

ARGOS, P.; KAMER, G.; NICKLIN, M. J. H.; WIMMER, E. Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picomaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucleic Acids Research*, v. 12, p. 7251–7267, 1984. In: KARASEV, A. V.; HAN, S. S.; IWANAMI, T. *Satsuma dwarf and related viruses belong to a new lineage of plant picorna-like viruses*. **Virus Genes**, Netherlands, v. 23, n. 1, p. 45–52. 2001.

ALMEIDA, A. M. R. Detecção e quantificação de vírus pelo teste de ELISA. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Eds.). **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. 2.ed. Londrina: Embrapa Soja, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001, cap. 4, p. 63-64.

ALMEIDA, A. M. R. Vírus da soja. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 23, p. 26-32. 2000. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=533>>. Acesso em 20 de janeiro de 2009.

ALMEIDA, A. M. R. **Viroses da soja no Brasil: sintomas, etiologia e controle**. Londrina: Embrapa Soja, doc. 306, 62 p. 2008.

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; HENNING, A. A.; VELOSO, J. F. S.; YORINORI, J. T. **Doenças da soja**. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). *Manual de fitopatologia*. São Paulo: Ceres, 1997. p.642-664.

ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; VALENTIN, N.; BENATO, L. C.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; OLIVEIRA, T. G.; BELINTANI, P.; GUERZONI, R. A.; NUNES JR., J.; HOFFMANN, L.; NORA, P. S.; NEPOMUCENO, A. L. **Necrose da haste da soja**. Documentos n. 221, 44 p. Londrina: Embrapa Soja, 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.; JARLSFORS, U.; GHABRIAL, S. A. *Soybean mosaic virus* potyvirus enhances the titer of two comoviruses in dually infected soybean plants. **Phytopathology**, v. 82, p. 1022-1027. 1992. In: 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, C. L.; KITAJIMA, E. W. Levantamento de viroses em cultura de feijão irrigado na região dos Cerrados. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p. 391. 1986. (Resumo).

ANJOS, J. R. N.; COSTA, A. S.; SPERANDIO, C. A.; COSTA, C. L. Mosaico-em-desenho. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Eds.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA/CNPAF, 1994. p. 285-300.

ASTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BIANCHINI, A.; KITAJIMA, E. W.; LIN, M. T. Ocorrência do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 307. 1985.

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 Agrônômico do Paraná, n. 63, p. 189-216. 1989.

BIANCHINI, A.; BERGAMIN FILHO, A. Reação induzida em feijoeiro pela interação do vírus do mosaico dourado e do mosaico-em-desenho. In: **Seminário sobre pragas, doenças e plantas daninhas do feijoeiro**. Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 21.

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.; 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.

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**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 410-413. 1996.

BRUENING, G. Comovirus group. **CMI/AAB Description of Plant Viruses**, Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England and the Association of Applied Biologists, n. 199, 5 pp. 1978.

BRUNT, A. A.; KENTEN, R. H. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting Cowpea (*Vigna unguiculata*) in Ghana. **Annals of Applied Biology**, v. 74, p. 67-74. 1973.

BUCK, K. W. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. **Advances in Virus Research**, v. 47, p. 159–251. 1996.

CALVERT, L. A.; GHABRIAL, S. A. Enhancement by soybean mosaic virus of *Bean pod mottle virus* titer in doubly infected soybean. **Phytopathology**, v. 73, p. 992-997. 1983. In: 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.

CAMARGO, I. J. B.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Inclusões cristalinas de um vírus isodiamétrico que afeta o feijoeiro. **Ciência e Cultura**, v. 21, p. 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**, v. 1, p. 207-214. 1976.

CAMPBELL, R. N.; TOCHIHARA, H. Radish enation mosaic virus is a strain of *Radish mosaic virus*. **Phytopathology**, v. 59, p. 1756–1757. 1969.

CARTIN, F. **Caracterización de dos nuevas razas del virus del mosaico fufoso del frijol**. 1973. Universidad de Costa Rica, San José.

CARVALHO, A. O. R. D.; VIEIRA, L. G. E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 593-600. 2001.

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**, v. 31, n. 5, p. 455-461. 2006.

CHEN, X.; BRUENING, G. Cloned DNA copies of *Cowpea severe mosaic virus* genomic RNAs: infectious transcripts and complete nucleotide sequence of RNA1. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 607–618. 1992a.

CHEN, X.; BRUENING, G. Nucleotide sequence and genetic map of cowpea severe mosaic virus RNA2 and comparisons with RNA2 of other comoviruses. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 682-692. 1992b.

COHEN, J.; ZEIDAN, M.; FEIGELSON, L.; NASLEININ, L.; ROSNER, A.; GERA, A. Characterization of a distinct *Carlavirus* isolated from Verbena. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1007-1015. 2003.

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. 1983. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília.

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**, v. 6, p. 523. 1981.

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

CUPERTINO, F. P.; LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, C. L. Occurrence of *Southern bean mosaic virus* in central Brazil. **Plant Disease**, v. 66, n. 8, p. 742-743. 1982.

CUPERTINO, F. P. Vírus do mosaico-em-desenho afetando plantações de soja no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, p. 246-250. 1987.

DOVAS, C. I.; KATIS, N. I. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the *Vitivirus* and *Foveavirus* genera in grapevine. **Journal of Virological Methods**, v. 107, p. 99-106. 2003a.

DOVAS, C. I.; KATIS, N. I. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the etiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 217-226. 2003b.

DI, D.; HU, C. C.; GHABRIAL, S. A. Complete nucleotide sequence of *Bean pod mottle virus* RNA1: sequence comparisons and evolutionary relationships to other comoviruses. **Virus Genes**, v. 18, p. 129-137. 1999.

EDWARSON, J. R.; CHRISTIE, R. G. Use of virus induced inclusion bodies in classification and diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 16, p. 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, 1996. p. 731-760.

FULTON, J. P.; SCOTT, H. A. Bean rugose mosaic and related viruses and their transmission by beetles. **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, p. 9-16. 1977.

FULTON, J.P.; SCOTT, H.A.; GAMEZ, R. Beetles. In: HARRIS, K. F.; MARAMOROSCH, K. (Eds.). **Vectors of plant pathogens.** New York: Academic Press, 1980. p. 115-132.

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**, v. 27, p. 343-350. 1977.

GAMEZ, R. Los virus del frijol en Centro América. II. Algunas propiedades y transmisión por crisomélidos del virus del mosaico rugoso del frijol. **Turrialba**, v. 22, n. 3, p. 249-257. 1972.

GAMEZ, R. Las enfermedades virales como factores limitantes en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en América Latina. **Fitopatologia**, Lima, v. 12, p. 24-26. 1977.

GAMEZ, R. *Bean rugose mosaic virus*. In: **CMI/AAB Descriptions of plant viruses**, n. 246, 1982.

GASPAR, J. O.; COSTA, A. S. Virus do mosaico angular do feijoeiro: purificação e ultraestrutura dos tecidos infectados. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 534-540. 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**, v. 30, n.1, p. 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**, v. 74, p. 132-134. 1990. In: 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.

GOLDBACH, R. Genome similarities between plant and animal RNA viruses. **Microbiology Science**, v. 4, p. 197-202. 1987.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 195-202. 1998.

GU, H.; CLARK, A. J.; DE SÁ, P. B.; PFEIFFER, T. W.; TOLIN, S.; GHABRIAL, S. A. Diversity among isolates of *Bean pod mottle virus*. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 446-452. 2002.

GU, H.; GHABRIAL, S. A. The *Bean pod mottle virus* proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants. **Journal of Virology**, v. 333, n. 2, p. 271-283. 2005.

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

HARRISON, B. D.; FINCH, J. T.; GIBBS, A. J.; HOLLINGS, M.; SHEPHERD, R. J.; VALENTA, V.; WETTER, C. Sixteen groups of plant viruses. **Virology**, v. 45, p. 356-363. 1971.

HATAYA, T.; UCHINO, K.; ARIMOTO, R.; SUDA, N.; SANO, T.; SHIKATA, E.; UYEDA, I. Molecular characterization of Hop latent virus and phylogenetic

relationships among viruses closely related to carlaviruses. **Archives of Virology**, v. 145, p. 2503-2524. 2000.

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

HOUWERS, D. J.; GIELKENS, A. L. J.; SCHAAKE JUNIOR, J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Maedi-Visna virus. **Veterinary Microbiology**, v. 7, p. 209-219. 1982.

HULL, R. **Matthew's Plant Virology**. 4. ed. Inglaterra, Londres: Academic Press, 2002. 1056 p.

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

KARASEV; A. V. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 293-324. 2000.

KARASEV, A. V.; HAN, S. S.; IWANAMI, T. Satsuma dwarf and related virus belong to a new lineage of plant picorna-like viruses. **Virus Genes**, v. 23, n. 1, p. 45-52. 2001.

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**, v. 5, p. 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**, v. 152, p. 1501–1506. 2007.

KOONIN, E. V.; CHUMAKOV, K. M.; GORBALENYA, A. E. Tentative identification of the RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA viruses. *FEBS Letters* 252, p. 42-46. 1989. In: KOONIN; E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. **The Journal of General Virology**, v. 72, p. 2197–2206. 1991.

KOONIN, E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. **The Journal of General Virology**, v. 72, p. 2197–2206. 1991.

KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V. Evolution and taxonomy of positivestrand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 375–430. 1993.

LE GALL, O.; IWANAMI, T.; JONES, A. T.; LEHTO, K.; SANFACON, H.; WELLINK, J.; WETZEL, T.; YOSHIKAWA, N. Comoviridae. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Eds.).

Virus taxonomy, eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. London: Elsevier Academic Press, p. 807–818. 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**, v. 6, p. 293-298. 1981.

LOLLATO, A. M.; SEPULCRI, O.; MARGORETE, D. **Cadeia produtiva do feijão: diagnóstico e demandas atuais.** Londrina: IAPAR, 2001. Documento 25. 48 p.

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**, v. 183, p. 405–409. 1991.

MALIOGKA, V.; DOVAS, C. I.; EFTHIMIOU, K.; KATIS, N. I. Detection and differentiation of Comoviridae species using a Semi-nested RT-PCR and a phylogenetic analysis based on the polymerase protein. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 404–409. 2004.

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**, v. 19, p. 430-436. 1994.

MORALES, F. J.; GÁMEZ, R. Beetle-transmitted viruses. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Bean production problems in the tropics.** Cali: CIAT, 1989. p. 363-377.

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

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. (Eds.) 1995. **Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Vienna & New York: Springer-Verlag. In: LI, C.; YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T.; ITO, T.; YOSHIDA, K.; KOGANEZAWA, H. Nucleotide sequence and genome organization of Apple latent spherical virus: a new virus classified into the family Comoviridae. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 541-547. 2000.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M. **101 Culturas: Manual de Tecnologias Agrícolas.** Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. 800 p.

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

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

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

ROSSI, T.; MANOLESCU, F. M. K. A CULTURA DO FEIJÃO NO MERCADO BRASILEIRO. In: **VIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino-Americano de Pós Graduação**. São José dos Campos: Programação e Anais de Resumos, 2004.

RUECKERT, R.; WIMMER, E. Systematic Nomenclature of *Picornavirus* proteins. **Journal of Virology**, v. 50, n. 3, p. 957–959, 1984.

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 Picornvirales that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. **Archives of Virology**, v. 154, p. 899–907, 2009.

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**, v. 27, n. 5, p. 525-527. 2002.

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599. 2007.

TECNOLOGIAS de Produção de Soja: região central do Brasil. Sistemas de Produção (Embrapa Soja, Embrapa Cerrados e Embrapa Agropecuária Oeste), Londrina, n. 12, p. 215-270, 2008.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882. 1997.

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**, v. 206, p. 583-590, 1995. In: 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.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa: ed. UFV, 2006. 600 p.

YANG, Z. N.; MIRKOV, T. E. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strains discrimination. **Phytopathology**, v. 87, p. 932-939. 1997.

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**, v. 34, p. 63–65. 2007.