

**MARCELO HENRIQUE SAVOLDI PICOLI**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM ISOLADO DO**  
*Turnip ringspot virus* **DE RÚCULA NO PARANÁ**

**MARINGÁ**  
**PARANÁ – BRASIL**  
**FEVEREIRO – 2011**

**MARCELO HENRIQUE SAVOLDI PICOLI**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM ISOLADO DO**  
*Turnip ringspot virus* **DE RÚCULA NO PARANÁ**

**Dissertação apresentada à**  
**Universidade Estadual de Maringá,**  
**como parte das exigências do**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Agronomia, para obtenção do título**  
**de Mestre.**

**MARINGÁ**  
**PARANÁ – BRASIL**  
**FEVEREIRO – 2011**

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

P598c Picoli, Marcelo Henrique Savoldi  
Caracterização parcial de um isolado do *Turnip  
ringspot virus* de rúcula no Paraná / Marcelo Henrique  
Savoldi Picoli. -- Maringá, 2011.  
57 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2011

1. *Turnip ringspot virus*. 2. *Comovirus*. 3. Rúcula  
(*Eruca sativa*, Mill.). 4. *Turnip ringspot virus* -  
Taxonomia. I. Souto, Eliezer Rodrigues de, orient. II.  
Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed.: 632.8

**MARCELO HENRIQUE SAVOLDI PICOLI**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM ISOLADO DO**  
*Turnip ringspot virus* **DE RÚCULA NO PARANÁ**

**Dissertação 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 Mestre.**

**APROVADA em 23 de fevereiro de 2011.**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Segundo Giampan

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida Fernandez

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto  
(Orientador)

## AGRADECIMENTO

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

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

Em especial ao meu avô João Savoldi, que nos deixou durante a realização deste trabalho, pelo carinho e pela força.

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

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

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

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por todo o conteúdo transmitido nas disciplinas.

Ao Dr. Álvaro Manuel Rodrigues Almeida, pesquisador da EMBRAPA Soja, pela orientação e por ter concedido o uso do laboratório de virologia desta entidade para a realização de parte do trabalho, e ao técnico Benato, pela disponibilidade e pela ajuda na realização dos experimentos, bem como a todos os funcionários que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Fernandez, pelo suporte oferecido no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap).

A todos os meus amigos e familiares, especialmente aos colegas de laboratório Patrícia, Jaqueline, Noemi, Cassiele, Taise, Pétria e Aninha, e aos meus colegas Antônio Augusto, Ricardo, Mauro, Érika e Reinaldo, que sempre me apoiaram e incentivaram no decorrer dos experimentos.

## **BIOGRAFIA**

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

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

Em março de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração de Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1. A Hospedeira .....	3
1.1. Problemas fitossanitários da cultura .....	5
2. “ <i>Picornalike viruses</i> ” .....	6
3. Família <i>Comoviridae</i> .....	9
4. Gênero <i>Comovirus</i> .....	10
5. <i>Radish mosaic virus</i> (RaMV) .....	12
6. <i>Turnip ringspot virus</i> (TuRSV) .....	13
7. Proteína RNA polimerase dependente de RNA ( <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> ) .....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	19
1. Origem do isolado viral .....	19
2. Determinação da gama de hospedeiras .....	19
3. Determinação das propriedades físicas <i>in vitro</i> do TuRSV-PR .....	20
4. Teste de transmissão por sementes do TuRSV-PR .....	20
5. Exames de microscopia eletrônica de plantas infectadas pelo TuRSV-PR .....	21
6. Extração dos RNAs totais de plantas infectadas pelo TuRSV-PR .....	21
7. Síntese do DNA complementar ao RNA viral .....	22
8. Amplificação por PCR dos cDNAs virais .....	22
9. Eletroforese dos produtos de amplificação por RT-PCR .....	23

10. Desenho de novos <i>primers</i> para o RNA 1 do TuRSV-PR .....	23
11. Purificação do isolado do TuRSV-PR .....	24
12. Determinação da massa molecular das proteínas capsidiais do TuRSV-PR .....	25
13. Clonagem dos produtos das ampliações por RT-PCR .....	26
14. Sequenciamento dos produtos de amplificação por RT-PCR .....	28
15. Análise filogenética comparativa do TuRSV-PR com outros Comovirus .....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
1. Determinação da gama de hospedeiras .....	30
2. Determinação das propriedades físicas in vitro do TuRSV-PR .....	34
3. Teste de transmissão por sementes do TuRSV-PR .....	35
4. Exames de microscopia eletrônica de plantas infectadas pelo TuRSV-PR .....	35
5. Amplificação por RT-PCR dos RNAs virais .....	36
6. Determinação da massa molecular das proteínas capsidiais do TuRSV-PR.....	37
7. Sequenciamento e análise filogenética comparativa do TuRSV-PR com outros <i>Comovirus</i> .....	39
CONCLUSÕES .....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Gama de hospedeiras do isolado paranaense do <i>Turnip ringspot virus</i> (TuRSV-PR) .....	31
<b>Tabela 2</b>	Similaridade genética dos <i>Comovirus</i> que apresentaram homologia com a sequência parcial de aminoácidos da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1) do TuRSV-PR .....	40
<b>Tabela 3</b>	Similaridade genética dos <i>Comovirus</i> que apresentaram homologia com a sequência parcial de aminoácidos da <i>Large coat protein</i> (RNA 2) do TuRSV-PR .....	41
<b>Tabela 4</b>	Distâncias evolucionárias dos comovírus baseada na comparação da sequência de aminoácidos parcial da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1) .....	44
<b>Tabela 5</b>	Distâncias evolucionárias dos comovírus baseada na comparação da sequência de aminoácidos parcial da <i>Large coat protein</i> (RNA 2) .....	45
<b>Tabela 6</b>	Distâncias evolucionárias dos comovírus baseada na comparação da sequência completa de aminoácidos da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1) .....	47
<b>Tabela 7</b>	Distâncias evolucionárias dos comovírus baseada na comparação da sequência completa de aminoácidos da <i>Large coat protein</i> (RNA 2) .....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Organização genômica do isolado de Toledo do <i>Turnip ringspot virus</i> (TuRSV) .....	15
<b>Figura 2</b>	Sintomas de infecção viral do TuRSV-PR em rúcula, evidenciando sintomas de redução de porte da planta (a); e deformação foliar, embolhamento e mosaico (b) .....	33
<b>Figura 3</b>	Sintomas de infecção viral do TuRSV-PR em folhas de rabanete da cultivar Minowase (a); couve-chinesa (b); nabo redondo (c); <i>Chenopodium amaranticolor</i> (d); e <i>Nicotiana benthamiana</i> (e) .....	33
<b>Figura 4</b>	Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão de preparações de folhas de rúcula infectadas, através do método de imersão foliar – <i>Leaf dip</i> (Realizado pelo Prof. Dr. Kitajima, E. W) .....	36
<b>Figura 5</b>	Produto de RT-PCR em gel de agarose, mostrando ampliações de 369 pb do RNA 1, utilizando os <i>primers</i> TuRSV RNA1 1F e TuRSV RNA1 2R descritos por Rajakaruna et al. (2007) (a), 559 pb do RNA 1, utilizando os <i>primers</i> RNA1 Rúcula Foward e RNA1 Rúcula Reverse descritos neste trabalho (b), e 168 pb do RNA 2, realizado com os <i>primers</i> TuRSV RNA2 1F e TuRSV RNA2 2R de Rajakaruna et al. (2007) (c) .....	37
<b>Figura 6</b>	Gel de poliacrilamida para determinação da massa molecular das proteínas capsidiais do TuRSV-PR, mostrando bandas correspondentes a 27 kDa ( <i>Small coat protein</i> ) e 42 kDa ( <i>Large coat protein</i> ) .....	38
<b>Figura 7</b>	Árvore filogenética dos comovírus baseada na comparação da sequência de aminoácidos parcial da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1) .....	42
<b>Figura 8</b>	Árvore filogenética dos comovírus baseada na comparação da sequência de aminoácidos parcial da <i>Large coat protein</i> (RNA 2) .....	43

<b>Figura 9</b>	Árvore filogenética dos comovírus baseada na comparação da sequência completa de aminoácidos da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1) .....	46
<b>Figura 10</b>	Árvore filogenética dos comovírus baseada na comparação da sequência completa de aminoácidos da <i>Large coat protein</i> (RNA 2) .....	48

## RESUMO

PICOLI, Marcelo Henrique Savoldi, MS. Universidade Estadual de Maringá. Fevereiro de 2011. **Caracterização parcial de um isolado do *Turnip ringspot virus* de rúcula no Paraná.** Professor Orientador: Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.

Um vírus causador de mosaico e distorções foliares em plantas de rúcula (*Brassicaceae*) cultivadas em Maringá-PR foi identificado por teste sorológico Elisa-indireto e microscopia eletrônica como sendo um comovírus. Os comovírus possuem genoma de RNA bipartido, senso positivo, denominados de RNA1 e RNA2, e infectam predominantemente *Fabaceae*. O *Turnip ringspot virus* (TuRSV) é um *Comovirus* que infecta plantas da família *Brassicaceae*, reportado apenas no hemisfério norte, causando uma variedade de sintomas foliares, que vão desde manchas cloróticas e anelares, até clorose completa e morte. Com o objetivo de determinar as propriedades moleculares do isolado do TuRSV do Paraná, fragmentos dos RNAs virais foram amplificados por RT-PCR. Após o sequenciamento do produto de amplificação de 917 pb do RNA1, este apresentou similaridade variando de 86% a 88% com sequências de aminoácidos do RNA1 de outros isolados do TuRSV, depositados no GenBank. Já o sequenciamento do produto de 168 pb do RNA2 do isolado do TuRSV do Paraná, amplificado com *primers* específicos para o isolado Toledo-USA do TuRSV, apresentou identidade de 97% com a sequência de aminoácidos do RNA2 desse vírus. O isolado do TuRSV do Paraná possui uma estreita gama de hospedeiras, infectando *Eruca sativa*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Nicotiana benthamiana* e *Chenopodium amaranticolor*, diferindo dos isolados B e M12 do TuRSV reportados na Croácia e Rússia, respectivamente, por não infectar mostarda-branca (*Brassica alba*) e couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Não foi evidenciada a transmissão do vírus por sementes no ensaio com 283 plântulas provenientes de rúcula infectadas. O ponto de inativação térmica

determinada para o TuRSV-PR foi de 65°C, o ponto final de diluição de 10<sup>-3</sup>, enquanto a longevidade *in vitro* foi de 28 dias. A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida do vírus purificado resultou em várias bandas, incluindo bandas de 27 e 41 kDa, como esperado para os comovírus. Este é o primeiro relato de infecção natural do TuRSV em rúcula, e da ocorrência desse vírus no hemisfério sul.

**Palavras-chave:** TuRSV, *Comovirus*, RT-PCR, hospedeiras, filogenia

## ABSTRACT

PICOLI, Marcelo Henrique Savoldi, MS. State University of Maringá. February 2011. **Partial characterization of an isolate of *Turnip ringspot virus* from rocket plants in Paraná State.** Adviser Professor: Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.

A virus associated with mosaic and leaf distortion on rocket plants (*Brassicaceae*) was isolated in Maringá, Paraná State, and identified as a comovirus based on indirect-Elisa and electronic microscopy. Comoviruses have positive-sense, single-stranded, bipartite RNA genomes designated RNA1 and RNA2 infecting predominantly *Fabaceae*. *Turnip ringspot virus* (TuRSV) is a *Comovirus* that infects *Brassicaceae* plants, reported only in the northern hemisphere, causing a variety of symptoms ranging from chlorotic spots and rings on leaves to complete chlorosis and death. In order to determine molecular properties of the Paraná isolate of TuRSV, fragments of viral RNAs were amplified by RT-PCR. After sequencing the amplified product of 917 bp from RNA1, an identity ranging from 86% to 88% was obtained with the amino acid sequences of RNA1 of other TuRSV isolates from the GenBank. The sequencing of the 168 bp product of RNA2 from Paraná isolate of TuRSV was amplified with specific primers for the Toledo-USA isolate of TuRSV, showing 97% of similarity with the amino acid sequence of RNA2 of this virus. The isolate of TuRSV from Paraná has a narrow host range, infecting *Eruca sativa*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Nicotiana benthamiana* and *Chenopodium amaranticolor*, differing from isolates B and M12 of TuRSV from Croatia and Russia, respectively, for not infecting white mostard (*Brassica alba*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). There was no seed transmission of the virus by 283 seedlings from infected rocket plants. The thermal inactivation point of TuRSV-PR was 65°C, the dilution end point was  $10^{-3}$ , and the *in vitro* longevity was 28 days. The polyacrylamide gel electrophoresis of the purified

virus revealed several bands, including the expected bands of 27 and 41 kDa, typical of *Comovirus*. This is the first report of the natural infection of TuRSV in rocket plants, and the occurrence of this virus in the southern hemisphere.

**Keywords:** TuRSV, *Comovirus*, RT-PCR, host range, phylogeny

## INTRODUÇÃO

Plantas de rúcula com sintomas de mosaico e distorções foliares foram encontradas em uma horta doméstica na cidade de Maringá, Paraná. Devido aos sintomas serem similares aos de uma infecção viral, foram realizadas inoculações mecânicas experimentais em plantas de *Nicotiana benthamiana*, que são relatadas como excelentes indicadoras da presença de vírus. As plantas inoculadas apresentaram sintomas de manchas anelares e clorose, aumentando as evidências de que os sintomas observados em rúcula seriam realmente causados por vírus. Folhas sintomáticas de rúcula e de *N. benthamiana* foram utilizadas como fonte de inóculo para inoculação mecânica em plantas de rúcula sadias. Estas plantas, por sua vez, desenvolveram os mesmos sintomas observados nas plantas de rúcula inicialmente encontradas.

Inicialmente suspeitou-se que esta infecção natural poderia estar associada ao *Turnip mosaic virus* (TuMV), gênero *Potyvirus*, pois existe o relato da ocorrência deste vírus no Brasil, infectando naturalmente o nabo, e experimentalmente a rúcula, causando nesta hospedeira sintomas de clareamento de nervuras, deformação foliar e mosaico (Ávila et al., 1980).

Desta forma, para confirmar a identidade do vírus envolvido, foram feitas reações de RT-PCR utilizando os *primers*: Poty 1, Poty 2, Sprimer, M4 e P89, universais para *Potyvirus* (Chavi et al., 1997; Colinet et al., 1998; Chen et al., 2001), porém não foram obtidas amplificações, após várias tentativas.

Folhas de rúcula e de *Nicotiana benthamiana* com sintomas de infecção viral foram preparadas com glutaraldeído e enviadas ao NAP/MEPA – Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo, para análises de microscopia eletrônica realizadas pelo Prof. Dr. Elliot W. Kitajima. Os resultados indicaram a presença de partículas isométricas, com diâmetro variando entre 25 e 30 nm, as quais poderiam ser de vírus, descartando



a hipótese de que a infecção da rúcula estivesse associada a um vírus de partículas alongadas, como as do TuMV, já reportado no Brasil.

Testes sorológicos do tipo Elisa-indireto realizados com um antissoro para o *Bean rugose mosaic virus*, gênero *Comovirus*, apresentaram reação positiva, quando utilizados extratos de folhas de rúcula e *N. benthamiana* infectadas com o vírus em estudo, sugerindo que o vírus em questão seria um *Comovirus*.

Devido ao aparecimento espontâneo desta virose em plantas de rúcula no município de Maringá-PR, fez-se necessário um estudo para a identificação deste patógeno, uma vez que este vírus causa danos severos nesta hospedeira e eventualmente em outras hortaliças de interesse comercial. Um estudo mais detalhado deste vírus poderá contribuir para se obter informações que possam ser úteis ao seu controle, e para trabalhos de melhoramento visando a obtenção de variedades resistentes.

O objetivo do presente trabalho foi identificar o isolado viral encontrado infectando espontaneamente plantas de rúcula, cultivadas no município de Maringá-PR, e determinar algumas de suas propriedades moleculares e biológicas.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. A Hospedeira

A área explorada com hortaliças no Brasil é estimada em 800 mil hectares, com produção de aproximadamente 16 milhões de toneladas. Esta atividade gera 2,4 milhões de empregos diretos e renda superior a 8 bilhões de reais (Hora et al., 2004).

Na última década, o consumo de saladas nas refeições tem se tornado cada vez mais importante ao redor do mundo, encorajados a partir de uma ligação positiva entre o consumo de matérias-primas frescas e a absorção de fitoquímicos promotores da saúde (Melchini, & Traka, 2010). Segundo os mesmos autores, evidências epidemiológicas e subsequentes estudos usando células e animais têm identificado as crucíferas como importantes fontes destes fitoquímicos que estão surgindo como novos potenciais agentes contra o câncer.

Das espécies oleráceas cultivadas no Brasil, as brassicáceas (ou crucíferas) constituem a família mais numerosa, destacando-se na região centro-sul. As crucíferas pertencem à família *Cruciferae* (ou *Brassicaceae*), sendo dicotiledôneas de grande importância econômica, pois nesta família encontram-se muitas hortaliças importantes na alimentação humana como: couve, couve-flor, couve-chinesa, brócolis, repolho, agrião, acelga, alface, rúcula, entre outras (Maringoni, 2005).

A rúcula (*Eruca sativa*, Mill.) é uma herbácea anual ou bianual da família *Brassicaceae*, originária da região do Mediterrâneo, conhecida e cultivada há séculos como especiaria ou condimento, principalmente pelos Romanos. Hoje a rúcula se encontra distribuída por todo o mundo, e sua parte aérea é consumida principalmente fresca, como salada, muito apreciada por seu sabor picante. Este vegetal é rico em proteínas e vitaminas A e C, contém cálcio e ferro e tem poucas calorias. Na sua composição, em cada 100 g de matéria fresca de rúcula, tem-se em média 91,7 g de água; 2,58 g de proteína; 1,6 g de fibra; 160 mg de cálcio;

1,40 mg de ferro; 47 mg de magnésio; 52 mg de fósforo; 369 mg de potássio; 27 mg de sódio; 0,47 mg de zinco; 15 mg de vitamina C; 0,044 mg de tiamina; 0,086 mg de riboflavina; 0,305 mg de niacina; 0,437 mg de ácido pantotênico e 0,073 mg de vitamina B6 (USDA, 2004).

A espécie de rúcula mais cultivada no Brasil é a *Eruca sativa* Miller, representada principalmente pelas variedades Cultivada e Folha Larga. Porém, também se encontram cultivos em menor escala da espécie *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., conhecida como rúcula selvática.

De toda a rúcula comercializada no Paraná pela CEASA-PR (Centrais de Abastecimento do Paraná S/A) no ano de 2008, 97,93% foram procedentes do próprio estado, de modo que apenas 2,07% desta hortaliça foram importados de outros estados (CEASA, 2008).

Em muitos países, a medicina tradicional atribui a esta planta propriedades terapêuticas como antiflogístico, depurativo, diurético, digestivo e afrodisíaco (Yaniv et al., 1998), além de propriedades como antisséptico, antioxidante, atividades antimicrobianas e antigenotóxicas e ação sobre células do hepatoma humano, devido a compostos como erucina e erisolina (Lamy et al., 2008).

De acordo com Alqasoumi et al., (2009), o extrato etanólico de folhas de rúcula apresentou atividades anti-secretoras, citoprotetivas e anti-úlceras contra lesões gástricas induzidas experimentalmente, atenuando a ulceração gástrica.

Segundo Khoobchandani et al. (2010), o óleo da semente de rúcula possui propriedades antibacterianas contra 97 % das bactérias Gram positivas e entre 74 e 97 % contra as bactérias Gram negativas resistentes a antibióticos. Os mesmos autores afirmam que este óleo apresenta eficácia farmacológica promissora e garante a presença de componentes bioativos responsáveis pelos efeitos benéficos observados em seus experimentos, elucidando o potencial da rúcula para ser usada na medicina tradicional como bioagente antimicrobiano e o potencial destaque deste alimento para possível uso clínico.

A erucina é um isotiocianato presente em rúcula que tem sido recentemente considerado como um promissor fitoquímico quimiopreventivo contra o câncer, em experimentos com células de adenocarcinoma de pulmão

humano realizados por Melchini et al. (2009). Resultados semelhantes foram obtidos por Harris & Jeffery (2008) e por Melchini & Traka (2010).

### **1.1. Problemas fitossanitários da cultura**

Segundo Fahl et al. (1998), as principais pragas da cultura rúcula são os pulgões (*Brevicoryne brassicae*), lagarta-da-couve (*Ascia monuste*), lagarta mede-palmo (*Trichoplus ni*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) e traça-das-folhas (*Plutella xylostella*).

A ocorrência de doenças nesta cultura está relacionada à presença de fontes de inóculo, condições favoráveis de clima e à presença de planta susceptível. A interação desses fatores pode possibilitar epidemias e a ocorrência de danos econômicos nas lavouras. As doenças fúngicas que mais atacam a rúcula são a ferrugem branca das folhas (*Albugo candida*), mancha de *Alternaria* (*Alternaria brassicae*), mancha de *Cercospora* (*Cercospora sp.*), mancha de *Septoria* (*Septoria lactucae*) e damping-off (*Rhizoctonia solani*) (Fahl et al., 1998).

Existem relatos da ocorrência de 22 vírus infectando naturalmente crucíferas (Gracia et al., 1990), sendo mais comumente reportados, o TuMV (*Turnip mosaic virus*), família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, o CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), família *Caulimoviridae*, gênero *Caulimovirus*, CMV (*Cucumber mosaic virus*), família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*, PVX (*Potato virus X*), família *Flexiviridae*, gênero *Potexvirus*, TCV (*Turnip crinckle virus*), família *Tombusviridae*, gênero *Carmovirus*, PoMV (*Pokeweed mosaic virus*), família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, BWYV (*Beet western yellow virus*), família *Luteoviridae*, gênero *Polerovirus*, e TYMV (*Turnip yellow mosaic virus*), família *Tymoviridae*, gênero *Tymovirus*. Destes, o TuMV e o CaMV são os mais disseminados e que mais danos econômicos têm causado a essas culturas (Spak et al., 1993).

No Brasil, há relatos do TuMV e CaMV infectando crucíferas em plantios comerciais e na vegetação espontânea, causando perdas econômicas nas culturas do rabanete, nabo e couve (Lima et al., 1980). Ávila et al. (1980) relataram a

ocorrência do TuMV, em plantas de rúcula, causando sintomas de clareamento de nervuras, deformação foliar e mosaico.

Na região de Maringá, PR, Cardoso et al. (1996), encontraram o CMV, o TuMV, e o CaMV infectando canola, causando sintomas de mosaico foliar, lesões necróticas, deformação foliar, clareamento de nervuras, distorção foliar e redução do porte.

O fato de o TuMV, CaMV e CMV estarem amplamente difundidos no Brasil, em diversas culturas comerciais e em plantas de vegetação espontânea (Ávila, 1979), aliado à eficiência de transmissão dos insetos vetores (Lima, 1979), evidencia o potencial de disseminação destes vírus para crucíferas, sendo recomendada a adoção de medidas preventivas de controle.

Ainda há relatos da ocorrência do RaMV (*Radish mosaic virus*), família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*, infectando rúcula, no hemisfério norte (Brunt et al., 1996).

## 2. “*Picornalike viruses*”

Os vírus conhecidos como “*Picornalike viruses*”, possuem muitos representantes que infectam plantas, onde se encontram as famílias *Comoviridae* e *Sequiviridae*. A família *Comoviridae* é composta por três gêneros: *Comovirus*, *Nepovirus* e *Fabavirus*. A família *Sequiviridae* representa os vírus dos gêneros *Sequivirus* e *Waikavirus*. Existem ainda, dois gêneros que não foram atribuídos a estas famílias: *Cheravirus* e *Sadwavirus*, mas que possuem propriedades em comum com outros picornavirales (Le Gall et al., 2007). Devido a esta dificuldade de enquadrar algumas espécies de vírus nos gêneros já existentes, Sanfaçon et al. (2009) propuseram a criação da família *Secoviridae*, incluindo os gêneros *Comovirus*, *Fabavirus*, *Nepovirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Sequivirus* e *Waikavirus*; e ainda a criação de um novo gênero nesta família: *Torradovirus*, cuja espécie tipo seria o *Tomato torrado virus*. Segundo o mesmo autor, esta classificação baseia-se em características comuns dos vírus que formariam a família *Secoviridae* como: infectar plantas usando proteínas especializadas chamadas proteínas de movimento e/ou capsídeos proteicos adaptados para esta

função; mesma estrutura das partículas (icosaédricas com simetria pseudo – T = 3); genoma de RNA senso positivo que tem uma estratégia de expressão da poliproteína; mesmo modo de replicação incluindo o tipo III da Helicase e tipo I da Polimerase; além de serem agrupados em um único ramo no dendrograma produzido a partir da sequência de aminoácidos da Pro-Pol (proteínase-polimerase).

Além da proposta de uma nova classificação mostrada acima, estudos sobre a morfologia da partícula, número e tamanho das moléculas de RNA genômico, e organização genômica do *Apple latent spherical virus* (ALSV), realizados por Li et al. (2000) mostram que este é um novo vírus que deveria ser classificado dentro da família *Comoviridae*, mas distinto dos gêneros já existentes, e do *Satsuma dwarf virus*, provavelmente agrupado com o *Cherry rasp leaf virus* (CRLV) e com o *Artichoke vein banding virus* (AVBV).

Os vírus do tipo picorna-like que infectam plantas são pertencentes às famílias *Comoviridae* e *Sequiviridae*. Porém os vírus da família *Sequiviridae* possuem genoma monopartido, ao passo que os vírus da família *Comoviridae* possuem o genoma dividido em duas moléculas de RNA (Matthews, 1992).

A taxonomia dos picorna-like vírus tem sofrido uma significativa revisão e diversas alterações ocorreram recentemente, devido ao conhecimento do completo sequenciamento genômico das espécies. Esta ordem de vírus contém patógenos que infectam vertebrados, insetos, artrópodos, plantas, fungos e algas (Sanfaçon et al., 2009).

A palavra “picorna” significa a união de outros dois termos: “pico”, que se refere ao pequeno tamanho dos vírions e “rna”, derivada da origem do material genético (Le Gall et al., 2008).

Segundo Goldbach, (1986), os vírus de genoma segmentado possuem vantagens sobre os vírus de genoma único, tais como rápida recombinação por rearranjo de RNA, aumento no tamanho do genoma, redução da letalidade, regulação da expressão traducional, e facilidade de se espalharem através de plantas e/ou por vetores. Os vírus com este tipo de genoma são considerados mais especializados em relação aos demais, desde que estes possam utilizar

mecanismos de transmissão eficientes. A única desvantagem dos vírus de genoma segmentado, é que estes apresentam uma reduzida eficiência na transmissão de hospedeira-a-hospedeira, em relação aos vírus de genoma não-segmentado. O mesmo autor ainda afirma que os vírus de plantas e vírus de animais evoluíram de um ancestral comum de genoma não segmentado.

De acordo com Karasev et al. (2001), devido ao fato de apenas os “picorna-like virus” terem representantes com genoma monopartido e bipartido, a divisão de um ancestral com genoma monopartido deve ter ocorrido depois da separação da linhagem dos vírus que infectam plantas. Os mesmos autores sugerem que esta separação genômica ocorreu pelo menos duas vezes, resultando em duas linhagens independentes de *Comoviridae* e *Satsuma dwarf virus-like*.

De acordo com Goldbach (1986), alguns vírus de plantas e animais têm um ancestral em comum, baseado na sequência de aminoácidos e na similaridade da organização genômica. O mesmo autor sugere a teoria de que um vírus de artrópodo tenha sido o ancestral comum tanto para os vírus de plantas como para os vírus de animais, evidenciando a importância do papel dos insetos na evolução dos vírus.

Segundo Roossinck (1997), a origem dos vírus de plantas é incerta, mas as relações entre vírus de plantas e vírus de animais sugerem uma origem comum, possivelmente um vírus de inseto. O mesmo autor ressalta que alguns domínios, como a RdRp, podem ter tido um ancestral comum, entretanto, outros domínios foram adquiridos dos hospedeiros, no decorrer da evolução, para fornecer novas funções que permitiam a adaptação a novos nichos ou para fornecer novos mecanismos de movimentação e transmissão.

Estudos das sequências dos *Nepovirus* e *Comovirus* realizados por Le Gall et al. (1995), sugerem uma estrutura da capa proteica em comum entre estes dois grupos de vírus, evidenciando a mesma origem evolucionária entre eles.

A adaptação dos *Nepovirus* aos nematóides como vetores pode ter sido um evento relativamente recente na evolução dos “picorna-like virus” de plantas, que ocorreu depois da divisão genômica que originou a linhagem dos *Comoviridae* (Karasev et al., 2001). O mesmo autor ainda sugere que o ancestral

dos “picorna-like virus” de plantas foi um “picorna-like virus” de insetos. Os insetos foram, por muito tempo, considerados como possíveis hospedeiros primitivos de um hipotético vírus ancestral aos vírus de RNA de senso positivo que infectam plantas (Roossinck, 1997).

### **3. Família *Comoviridae***

Esta família possui vírus não envelopados, com aproximadamente 30 nm de diâmetro, cuja transmissão pode ocorrer de forma mecânica ou por vetores como besouros coleópteros de forma não-persistente ou semi-persistente, ou seja, os vírus não se replicam dentro do vetor (Matthews, 1992). Estes vírus estão provavelmente distribuídos geograficamente pelo mundo inteiro.

Os vírus pertencentes a esta família apresentam RNA de fita simples, senso positivo, em dois segmentos encapsulados separadamente. A estrutura da partícula apresenta simetria icosaédrica ( $T = 1$ , pseudo  $T = 3$ ) e seu capsídeo contém 32 capsômeros formados por 12 pentâmeros e 20 trímeros (Le Gall et al., 1995).

Segundo Goldbach & Wellink (1996), preparações virais dos vírus pertencentes a esta família apresentam três componentes de sedimentação: T – *Top component* (partículas vazias), M – *Middle component* (partículas usualmente contendo uma única molécula do RNA 2) e B – *Bottom component* (partículas contendo uma única molécula do RNA 1).

Todas as espécies de vírus da família *Comoviridae* apresentam vetores biológicos, os *Comovirus* são transmitidos por besouros (principalmente da família *Chrysomelidae*), os *Fabavirus* são transmitidos por afídeos, e muitos *Nepovirus* são transmitidos por nematóides. Todos são facilmente transmitidos por inoculação mecânica experimental. Transmissão por sementes e/ou pólen são muito comuns entre os nepovírus, porém raras entre os comovírus e fabavírus (Sanfaçon et al., 2009).

Os vírus de RNA de plantas possuem várias estratégias envolvidas na expressão genômica: utilizam genoma dividido, possuem RNAs mensageiros subgenômicos, “*frameshifting*” (deslocamento do quadro de leitura), supressão



do códon de parada, processamento de poliproteína, entre outros, que resultam na capacidade destes vírus em se adaptar facilmente a diferentes nichos ecológicos (Roossinck, 1997).

A família *Comoviridae* é composta por três gêneros: *Fabavirus*, *Nepovirus* e *Comovirus*.

O gênero *Fabavirus* tem como espécie tipo o *Broad bean wilt virus I* (BBWV-I). As quatro espécies deste gênero apresentam uma ampla gama de hospedeiros entre as dicotiledôneas e algumas famílias de monocotiledôneas. Os sintomas são manchas anelares, mosqueado, mosaico, distorção, murchamento e necrose apical. Na natureza, são transmitidos de maneira não-persistente por afídeos (Kobayashi et al., 2003; Kobayashi et al., 2005).

O gênero *Nepovirus* possui o *Tobacco ringspot virus* (TRSV) como espécie tipo, e a gama de hospedeiras deste gênero varia de larga até restrita a uma única espécie de planta, dependendo do vírus. Sintomas de manchas anelares são característicos, mas mosqueados e manchas cloróticas também são freqüentes (Walkey, 1985). Vinte espécies são adquiridas e transmitidas de maneira persistente por nematóides (*Xiphinema* e *Longidorus* spp.), três são transmitidas por pólen e uma é transmitida por ácaros. As outras espécies de nepovírus não possuem vetores conhecidos (Wood, 1998).

#### **4. Gênero *Comovirus***

Os comovírus são vírus de genoma composto por duas partículas de RNA, sendo estas de fita simples, senso positivo, encapsulados separadamente em partículas icosaédricas com diâmetro aproximado de 28 nm (Wellink, 1998).

A espécie tipo do gênero *Comovirus* é o *Cowpea mosaic virus* (CPMV), em que seu RNA 1 contém 5889 nucleotídeos e o RNA 2 é formado por 3481 nucleotídeos. As duas moléculas contêm a proteína VPg na extremidade 5' e cauda poliadenilada na extremidade 3'. Esta espécie viral possui quantidades similares de dois polipeptídeos de pesos moleculares de 23000 e 37000 kDa, proteínas S (*Small*) e L (*Large*), que constituem a capa protéica das partículas (Goldbach & Wellink, 1996).

Este gênero compreende 15 espécies definitivas de vírus com a última espécie adicionada ao gênero há mais de 20 anos (Brunt et al., 1982). Segundo Petrzik et al. (2005), a gama de hospedeiras dos comovírus geralmente é estreita, sendo que 11 dos 15 membros do gênero infectam apenas espécies de plantas da família *Fabaceae*. Algumas exceções são os vírus APMoV (*Andean potato mottle virus*), RaMV (*Radish mosaic virus*), TuRSV (*Turnip ringspot virus*) e SqMV (*Squash mosaic virus*), que infectam, entre outros, crucíferas e solanáceas. A transmissão na natureza é feita por besouros, especialmente aqueles pertencentes à família *Chrysomelidae*. Os besouros conservam sua habilidade de transmitir o vírus por dias ou semanas, ou seja, a transmissão ocorre de forma semi-persistente.

Segundo Matthews (1992), o RNA 1 ou RNA B (*bottom component*), codifica proteínas para a replicação viral e processos proteolíticos, além de codificar a proteína viral ligada a extremidade 5' de ambos RNAs (*virus protein genome-linked* – VPg). Já o RNA 2 ou RNA M (*middle component*), codifica proteínas necessárias à movimentação do vírus célula-a-célula, e à movimentos a longas distâncias (proteínas MP). Este RNA também codifica proteínas que participam da formação do capsídeo. Os dois RNAs são necessários para que ocorra a infecção sistêmica das plantas hospedeiras.

Cada molécula de RNA codifica uma única ORF (“*open reading frame*” ou quadro aberto de leitura), que sofre clivagens (Komatsu et al., 2007). As proteínas virais funcionais são produzidas por precursores de poliproteínas que sofrem clivagens em ambas poliproteínas do RNA 1 e RNA 2 por uma protease, codificada pelo vírus em regiões conservadas do material genético (Petrzik et al., 2005).

O genoma de todos estes vírus codifica essencialmente o mesmo grupo de genes replicativos, utilizando mecanismos de expressão similares envolvendo o processamento do precursor da poliproteína. Baseado em análises filogenéticas de suas proteínas associadas à replicação, Koonin (1991) encontrou relações evolucionárias próximas entre estes organismos.

A organização genômica é conservada entre os picornavirales. O genoma dos *Picornavirus* codificam três principais grupos de genes: P1 – genes estruturais codificando proteínas capsidiais VP1-VP4; e dois grupos de genes não estruturais: P2 e P3, codificando as quatro principais proteínas associadas à replicação: helicase, VPg, protease e RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) (Karasev et al., 2001).

O critério de demarcação de espécie para o gênero *Comovirus*, de acordo com Le Gall et al. (2005 apud Komatsu et al., 2007), se baseia na idéia de que espécies diferentes apresentam menos que 75% de similaridade nas sequências de aminoácidos da RdRp e LCP (*Large coat protein*). Segundo o mesmo autor, neste gênero, a RdRp e a LCP são as proteínas mais conservadas codificadas pelo RNA1 e RNA2, respectivamente, exceto a VPg, e esta identidade na sequência de aminoácidos é usada como critério de demarcação de espécie.

### **5. *Radish mosaic virus* (RaMV)**

O RaMV foi originalmente descrito na Califórnia (USA) em 1939 (Koloniuk et al., 2008). Depois foi encontrado no Japão, Europa, África (Koenig & Fisher, 1981) e mais recentemente na Ásia (Farzadfar et al., 2004), sugerindo que esteja distribuído ao redor do mundo, embora este vírus ainda não tenha sido encontrado no Brasil.

O RaMV é um vírus transmitido por besouros, infectando crucíferas, causando mosaico, manchas anelares e enrugamento de folhas (Komatsu et al., 2007).

Koenig & Fisher (1981), propuseram dois grupos de isolados do RaMV: um americano, que inclui os isolados da Califórnia e Japão e outro europeu, que inclui os isolados da Europa e também do Marrocos.

Segundo Plakolli & Stefanac (1976), entre os isolados de RaMV europeus, não existem diferenças sorológicas entre os isolados da Iugoslávia, Reino Unido, Alemanha e Itália. Porém, Spak & Kubelková (2000), ao analisarem a variabilidade sorológica de isolados europeus do RaMV, através do teste de difusão dupla em ágar, encontraram diferenças sorológicas significativas

nos isolados da República Tcheca e da Rússia, de acordo com a localização geográfica dos isolados e de suas hospedeiras, mas não puderam definir estirpes típicas com os métodos usados.

Milne et al. (1980) foram os primeiros a relatar a ocorrência do RaMV infectando rúcula na Itália.

Segundo Komatsu et al. (2007), o RNA 1 do isolado japonês do RaMV possui 6064 nucleotídeos excluindo a cauda poli A, na extremidade 3', que codifica uma cadeia de 1853 aminoácidos, resultando em uma poliproteína de 210 kDa; já o RNA 2 deste isolado apresenta 4020 nucleotídeos (exceto cauda poli A), que codifica uma cadeia de 1095 aminoácidos, formando uma poliproteína de 123 kDa.

## **6. *Turnip ringspot virus* (TuRSV)**

Inicialmente, o *Turnip ringspot virus* foi considerado uma estirpe do *Radish mosaic virus*, pois ambos induzem sintomas parecidos, na mesma gama de hospedeiras.

Após estudo realizado por Petrzik & Koloniuk (2010), estes concluíram que o TuRSV e o RaMV infectam as mesmas hospedeiras e apresentam similaridade por volta de 79% na LCP. Entretanto, possuem uma baixa identidade ao longo do genoma, o que evidencia que estes dois vírus pertencem a espécies distintas (Koloniuk & Petrzik, 2009), conforme descrito por Koloniuk et al.(2008).

Este vírus infecta *Brassicaceae*, causando uma variedade de sintomas que variam de manchas anelares e cloróticas em folhas até clorose completa e morte da planta (Khandekar et al., 2009). Segundo Rajakaruna et al. (2007), os sintomas da infecção do TuRSV parecem ser sazonais, sendo mais proeminentes nos meses de inverno do que no verão.

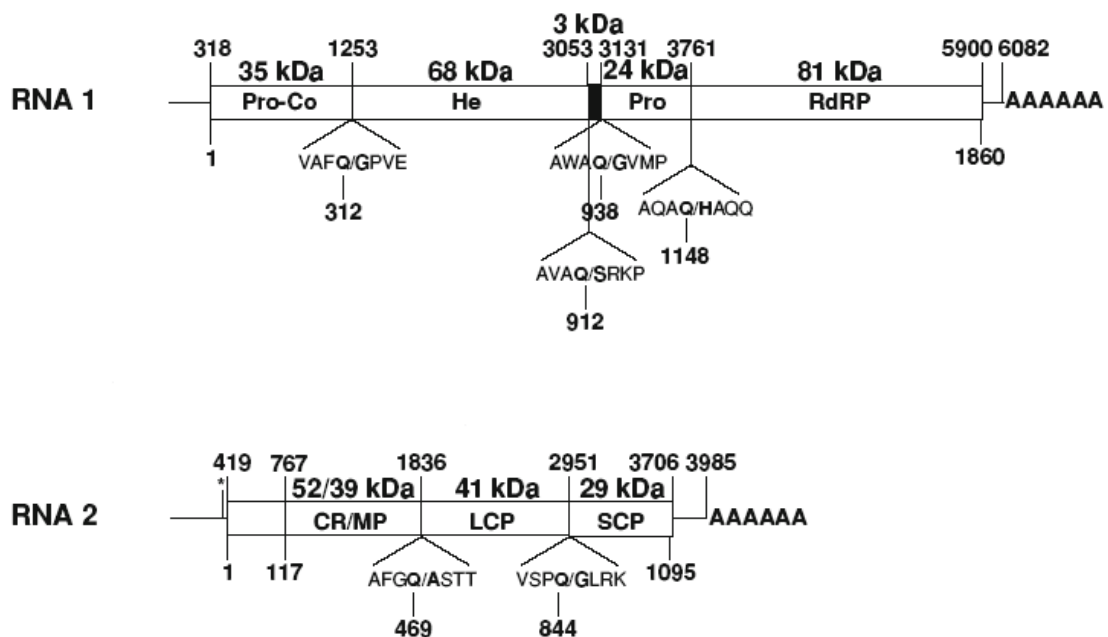
O TuRSV apresenta reação sorológica positiva com o antissoro contra RaMV (Koloniuk & Petrzik, 2009), porém os mesmos autores ressaltam que estes vírus são considerados espécies distintas.

Em estudo das sequências de aminoácidos da LCP e SCP (*Small coat protein*) de cinco vírus do gênero *Comovirus*, Petrzik & Koloniuk, (2010), afirmam que o TuRSV e o RaMV não são estirpes ou isolados distintos de uma mesma espécie, mas sim, espécies diferentes, e a alta similaridade genética observada nas sequências destes vírus pode ter sido causada pela recente separação deles de um ancestral em comum. Os mesmos autores propõem o uso da similaridade menor que 75% entre as sequências de aminoácidos da LCP e SCP combinados, ao invés do uso apenas da LCP, como critério de definição de espécies do gênero *Comovirus*, em função da analogia com critérios aceitos para outros gêneros conhecidos dentro da família *Secoviridae* proposta.

Amplificações de RT-PCR utilizando *primers* denominados pan-comovirus desenvolvidos pela empresa Agdia®, cujas sequências ainda não foram publicadas, revelaram que o TuRSV é um membro dos *Comovirus*, devido à amplificação da região codificadora de uma única ORF de 143 aminoácidos, semelhante ao obtido para o *Cowpea mosaic virus*, espécie tipo dos *Comovirus* (Rajakaruna et al., 2007). As sequências do RNA 1 e RNA 2 do TuRSV amplificadas por estes autores foram muito similares às sequências de outras espécies do gênero *Comovirus*.

Segundo Khandekar et al. (2009), a poliproteína codificada pelo RNA 1 do TuRSV contém uma extensão de três aminoácidos que não é encontrada em nenhuma proteína do RaMV, evidenciando que este comovírus, seja próximo, porém distinto do RaMV.

O genoma completo do isolado de Toledo do TuRSV compreende duas moléculas de RNA de senso positivo, de fita simples, contendo cauda poliadelinada, conforme Figura 1.



**Figura 1** Organização genômica do isolado de Toledo do *Turnip ringspot virus* (TuRSV). As caixas indicam as regiões que codificam proteínas: *Pro-Co* proteinase cofator, *He* RNA helicase, *caixa preta* virus protein genome-linked (VPg), *Pro* protease, *RdRp* RNA-dependent RNA polymerase, *CR/MP* replicase cofator/movement protein, *LCP* large coat protein, *SCP* small coat protein, *linhas horizontais* regiões 5' e 3' não traduzidas, AAAAAA cauda poli A. O tamanho (em kDa) das proteínas estão listados acima da representação de cada proteína. Números acima das caixas indicam as posições dos nucleotídeos, enquanto os números abaixo das caixas indicam a posição dos aminoácidos. Os três aminoácidos de cada lado do sítio de clivagem proteolítica (em negrito) são mostrados entre os sítios na poliproteína, e a posição do aminoácido na poliproteína é indicado. O asterisco na sequencia do RNA 2 indica um códon de início putativo. (Khandekar et al., 2009).

Segundo Khandekar et al. (2009), o RNA 1 deste isolado é composto de 6082 nucleotídeos, enquanto o RNA 2 possui 3985 nucleotídeos, sem contar a cauda poli A de ambos. O RNA 1 possui 317 nucleotídeos não traduzidos na posição 5', ao passo que o RNA 2 apresenta 418 nucleotídeos não traduzidos. A região 3' não traduzida do RNA 1 contém 182 nucleotídeos depois do códon de parada, enquanto a mesma região do RNA 2 contém 279 nucleotídeos. Os 47 nucleotídeos presentes na região final -5' das duas moléculas diferem entre si apenas em quatro posições (91% de similaridade), com os 12 nucleotídeos terminais sendo idênticos. A região 5' terminal destes RNAs também contém

uma sequência (UAUUAAAU) característica de muitos comovírus (Komatsu et al., 2007). Os 170 nucleotídeos presentes na região 3' dos dois RNAs diferem apenas em 30 posições (82% de similaridade), com os 18 nucleotídeos finais idênticos (Khandekar et al., 2009).

O códon de iniciação do RNA 1 está localizado no nucleotídeo 318, e o último nucleotídeo do códon de terminação está na posição 5900, codificando uma única ORF de 1800 aminoácidos, com peso molecular próximo de 211 kDa. O códon de iniciação do RNA 2 está localizado no nucleotídeo 419, enquanto o último nucleotídeo do códon de parada encontra-se na posição 3706. O RNA 2 contém um códon de iniciação na posição 24 antes do primeiro códon de iniciação, sendo este um códon de iniciação putativo. Este códon poderia permitir a tradução de três aminoácidos (MRH) que termina em um códon de parada. Pelo menos dois outros comovírus (CPMV e SqMV) também possuem pequenas ORFs antes do códon de início autêntico na poliproteína do RNA 2, sugerindo que esta sequência pode ser de característica regulatória. A poliproteína do RNA 2 poderia ter, então, 1095 ou 978 aminoácidos, dependendo de qual códon de iniciação é usado. Isso resulta em uma poliproteína com peso molecular de 122 ou 108 kDa (Khandekar et al., 2009).

A molécula de RNA 1 codifica, no sentido 5' – 3' as seguintes proteínas: Cofator Protease (Co-Pro); Helicase (Hel); Virus Protein genome linked (VPg); Protease (Pro); RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), sendo estas de peso molecular 35, 68, 3, 24 e 81 kDa, respectivamente (Khandekar et al., 2009).

Segundo Khandekar et al. (2009), a região correspondente ao cofator proteinase é a região menos conservada entre os comovírus, onde sua similaridade varia entre 22% e 62%. Segundo o mesmo autor, a VPg é a região mais conservada, com identidade genética variando entre 61% e 100%.

O RNA 2, no sentido 5' – 3', apresenta a seguinte sequência de codificação de proteínas: Cofator de Replicação (CR); Proteína de Movimento (MP); Proteínas do Capsídeo. As proteínas do capsídeo são em número e tamanho variável para cada espécie, informação que pode ser usada na diferenciação e classificação de espécies. Os comovírus possuem duas proteínas

capsidiais, chamadas de *Small coat protein* (SCP) e *Large coat protein* (LCP), com tamanho médio de 20 e 40 kDa, respectivamente (Rajakaruna et al., 2007).

Processos proteolíticos da poliproteína do RNA 2 podem gerar quatro polipeptídeos de 52 ou 39 kDa, dependendo do códon de início usado, além da LCP de 41 kDa e da SCP de 29 kDa. A proteína de 52 kDa contém a proteína completa de 39 kDa, na região C-terminal final. Em outros comovírus, proteínas com a mesma localização genômica de 52 kDa servem como um cofator (CR) necessário para a replicação do RNA 2, enquanto aquela de 39 kDa são proteínas de movimento (MPs) (Goldbach & Welling, 1996).

Em alinhamento múltiplo de sequências, Khandekar et al., (2009) encontraram regiões de aminoácidos que são específicas do TuRSV, tanto para o RNA 1 como para o RNA 2, que podem ser usadas para a síntese de *primers* específicos para diagnose molecular deste vírus.

### **7. Proteína RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*)**

A descoberta de que a sequência de aminoácidos que codifica a proteína RNA polimerase dependente de RNA contém segmentos altamente conservados em vírus de RNA de senso positivo sugere que esta enzima está relacionada com a replicação destes vírus (Koonin et al., 1989). O mesmo autor cita a possibilidade de que diferentes grupos de vírus de RNA de dupla fita podem ter sido originados de diferentes grupos de vírus de RNA de senso positivo.

A replicação é a função mais importante requerida para o ciclo de vida dos vírus de genoma de RNA e como consequência, a RdRp é a única proteína universalmente conservada dos vírus de RNA de senso positivo (Maliogka et al., 2004).

Segundo Koonin (1991), o genoma de todos os vírus de RNA de senso positivo aparentemente codifica a proteína RNA polimerase dependente de RNA. Em análise comparativa das sequências de aminoácidos desta proteína, o mesmo autor sugere que esta comparação pode fornecer as bases necessárias para a criação da taxonomia filogenética destes vírus, visto que a RdRp é a única



proteína viral que contém “*motifs*” (ou motivos) conservadas nas diversas classes de vírus.

Em análise das seqüências de aminoácidos de todas as classes de vírus de RNA de senso positivo, Koonin (1991) descreveu a existência de oito motivos (I-VIII) na região da polimerase, agrupando os vírus em três supergrupos diferentes, com características comuns entre seus membros. Estes motivos são trechos extremamente conservados, com funções específicas na replicação dos vírus.

Nos comovírus, esta polimerase tem um tamanho aproximado de 84 kDa e está localizada na região C-terminal do RNA1 (Rajakaruna et al., 2007). Este trecho contém a seqüência GDD que desempenha o papel de catalisar a reação da polimerase. O comprimento da RdRp, entre os *Comovirus*, varia entre 703 e 713 aminoácidos (Koloniuk, et al., 2008).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Origem do isolado viral

O isolado viral foi obtido de plantas de rúcula cultivadas em uma horta no município de Maringá-PR, o qual após a identificação e caracterização parcial, biológica e molecular, descrita neste trabalho, passou a ser denominado de TuRSV-PR. O vírus foi mantido em plantas de rúcula da variedade Cultivada, mantidas em estufa plástica, através de inoculações mecânicas periódicas.

### 2. Determinação da gama de hospedeiras

O teste de determinação da gama de hospedeiras foi realizado em casa de vegetação. Foram inoculadas plantas de 52 espécies botânicas (Tabela 1), pertencentes às famílias *Amaranthaceae* (*Chenopodiaceae*), *Asteraceae*, *Apocynaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Lamiaceae* e *Alliaceae*.

O extrato bruto de plantas foi obtido macerando-se folhas sintomáticas de rúcula em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0 na proporção de 10 ml de tampão para cada grama de folha. Foram cultivadas quatro plantas por vaso, em vasos plásticos nº 3, contendo uma mistura de solo, areia e substrato. O cultivo foi feito em 8 vasos para cada espécie, sendo 6 vasos inoculados, e 2 vasos não inoculados deixados como testemunha. As plantas foram inoculadas com aproximadamente 15 dias após a germinação, utilizando-se carvão ativado em pó como abrasivo. Plantas testemunhas foram inoculadas com carvão em pó, mas utilizando-se apenas solução tampão, sem a presença de folhas maceradas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 50 dias após a inoculação para a observação dos sintomas.

### **3. Determinação das propriedades físicas *in vitro* do TuRSV-PR**

As propriedades *in vitro* são testes realizados com extrato bruto de plantas sintomáticas para determinar o Ponto de Inativação Térmica (TIP), Ponto Final de Diluição (DEP) e Longevidade *in vitro* (LIV). Os testes foram realizados de acordo com metodologia proposta por Noordam (1973 apud Walkey, 1985).

O Ponto de Inativação Térmica é a temperatura em que o vírus é inativado. O TIP foi determinado através da maceração de folhas sintomáticas em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0. Cada alíquota de 5 ml foi aquecida em tubo de ensaio em banho-maria a temperaturas que variaram de 5 em 5° C de 30° C a 100° C, por 10 minutos. Logo em seguida, as amostras foram colocadas em banho de gelo. O extrato referente a cada temperatura foi inoculado em plantas de rúcula de cinco vasos, contendo quatro plantas por vaso, deixando-se um vaso sem inoculação como testemunha. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para a observação do aparecimento de sintomas.

O Ponto Final de Diluição é a mais baixa diluição que um extrato bruto pode infectar através de inoculação mecânica. O extrato de plantas infectadas foi diluído em solução tampão fosfato de sódio em séries de 10 vezes, ou seja, as amostras foram diluídas sucessivamente de  $10^{-1}$  até  $10^{-10}$ . Em seguida foram inoculados em plantas de rúcula conforme descrito para o TIP e mantidos em casa de vegetação.

O teste de Longevidade *in vitro* é utilizado para determinar o tempo de armazenamento em que o extrato perde a infectividade. O teste foi feito armazenando-se, sob temperatura ambiente (22°C), alíquotas de extrato bruto de plantas infectadas por diferentes períodos de tempo que variaram entre 01 e 45 dias. Após cada dia, o extrato foi inoculado em plantas de rúcula de cinco vasos, com quatro plantas por vaso, deixando-se um vaso como testemunha, para posterior observação dos sintomas.

### **4. Teste de transmissão por sementes do TuRSV-PR**

Foram coletadas 437 sementes provenientes de plantas de rúcula infectadas experimentalmente por inoculação mecânica com o vírus estudado.

Estas foram semeadas em bandejas contendo substrato e, aos 10 dias após a germinação, 283 plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo uma mistura de solo, areia e substrato, na quantidade de quatro plântulas por vaso. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 45 dias para a observação dos sintomas.

### **5. Exames de microscopia eletrônica de plantas infectadas pelo TuRSV-PR**

Exames de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados em folhas de rúcula e *Nicotiana benthamiana* inoculadas, fixadas em glutaraldeído, através do método de imersão foliar rápida (*Leaf dip*). As amostras fixadas foram enviadas para o NAP/MEPA – Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, e foram analisadas sob microscópio eletrônico de transmissão pelo Prof. Dr. Elliot W. Kitajima.

### **6. Extração dos RNAs totais de plantas infectadas pelo TuRSV-PR**

A extração dos RNAs totais foi realizada macerando-se 100 mg de folhas frescas de rúcula com sintomas de infecção viral em nitrogênio líquido, que foram transferidas para um micro-tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 1 ml de TRIZOL<sup>®</sup> e vigorosamente agitados por um minuto. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e depois adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio para cada 1 ml de TRIZOL<sup>®</sup>. Os micro-tubos foram agitados por 15 segundos e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, fez-se uma centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4° C. A fase aquosa foi coletada em um novo tubo, onde foi adicionado 0,5 ml de isopropanol, e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75%. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 7.500 rpm por 5 minutos a 4° C. Após descartar

o sobrenadante, o *pellet* secou em temperatura ambiente por 10 minutos e foi ressuspenso em 40 µl de água DEPC (Dietil pirocarbonato 0,01%) e incubado a uma temperatura de 55°C por 10 minutos.

Amostras não inoculadas também foram utilizadas na extração, para posteriores comparações de controle negativo.

### **7. Síntese do DNA complementar ao RNA viral**

O cDNA foi obtido através de uma reação contendo 4 µl do RNA total, 4 µl do *primer* randômico, 2 µl de dNTP mix (10 mM) e 3 µl de água DEPC (0,01%). As amostras foram aquecidas a 65° C por 5 minutos, no termociclador, e imediatamente resfriadas no gelo por um minuto. A esta mistura, adicionou-se 4 µl de 5X First-strand Buffer, 4 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de 0,1 DTT e 0,5 µl de RNase out, e então as amostras foram incubadas no termociclador a 25° C por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 1µl da enzima transcriptase reversa (M-MLV-RT) e levou-se ao termociclador a 25° C por 10 minutos e em seguida a 42° C por 50 minutos.

### **8. Amplificação por PCR dos cDNAs virais**

As reações de polimerização em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando-se 5µl do cDNA, 5µl de 10X PCR Buffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de dNTP mix (10 mM), 2 µl de cada *primer* (TuRSV RNA1 1F e TuRSV RNA1 2R, para o RNA 1 e TuRSV RNA2 1F e TuRSV RNA2 2R para o RNA 2), 1 µl da enzima *Taq* DNA polimerase e 30 µl de água DEPC (0,01%). As reações foram mantidas em termociclador a uma temperatura de 92° C por um minuto para o início da desnaturação, depois passaram por 35 ciclos de 92° C por um minuto para a desnaturação, 45° C por um minuto para o anelamento e 72° C por um minuto para a extensão, e por último, procedeu-se um ciclo de 72° C por 10 minutos para a extensão final.

As reações foram realizadas utilizando-se plantas inoculadas com o TuRSV-PR e também com plantas não inoculadas, para controle negativo.

Os *primers* utilizados foram os mesmos de Rajakaruna et al. (2007), sendo, o *primer* senso, o TuRSV RNA1 1F: 5' TCGCAGGCTAGAAGA TTGTGA 3'; e o *primer* anti-senso TuRSV RNA1 2R: 5' GGCCCTAA GTGTTCTGGTC 3', que amplificam um fragmento de 369 pares de bases do RNA 1 (nucleotídeos 705-1073) e o *primer* senso TuRSV RNA2 1F: 5' CTGA GCGCCTAAGTGATGTTCT 3'; e o anti-senso TuRSV RNA2 2R: 5' CTTTA CCTCGGATAACCACTGTTGT 3', que amplificam um fragmento de 168 pares de bases do RNA 2 (nucleotídeos 23-190).

### **9. Eletroforese dos produtos de amplificação por RT-PCR**

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Para cada poço, utilizou-se 10 µl do produto de PCR juntamente com 1 µl do tampão de corrida blue juice. Como parâmetro de comparação, usou-se no primeiro poço 1 µl de Ladder (100 pb), misturado com 3 µl do tampão de corrida (TAE 1X) e 1 µl do corante blue juice. O tampão de corrida utilizado foi o TAE 1X – Tris acetato EDTA (1 mM de EDTA, 40 mM de Tris-acetato, pH 8,3), e os géis correram a uma voltagem de 85 V, por uma hora.

Após a eletroforese, os géis foram corados com 1,5 µl de brometo de etídio, sob agitação em tampão de corrida por 20 minutos. Com o auxílio de um aparelho de luz ultra-violeta foto documentador, os géis foram analisados e fotografados.

### **10. Desenho de novos *primers* para o RNA 1 do TuRSV-PR**

Após sequenciamento parcial do RNA 1 do isolado em estudo, desenhou-se um par de *primers*, comparando-se a sequência obtida anteriormente com o genoma do RNA 1 do isolado de Toledo do TuRSV, com o qual o isolado estudado apresentou maior similaridade. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer Design<sup>®</sup>, cujas sequências são: RNA 1 Rúcula Foward: 5' ACACTTAGGGCCTTTGTTGG 3' e RNA 1 Rúcula Reverse: 5' CCTCCTAGGTGGTCCTGTCTC 3' para amplificar um fragmento de 559 pares

de bases, correspondentes à região C-terminal do RNA 1, onde se encontra o código correspondente à RdRp.

As reações de RT-PCR com estes *primers* foram realizadas conforme descrito acima, porém, a temperatura de anelamento dos 35 ciclos foi de 60° C ao invés de 45° C.

Os produtos da reação de RT-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e visualizados sob luz ultra-violeta, conforme descrito acima.

### **11. Purificação do isolado do TuRSV-PR**

A purificação do vírus em estudo foi realizada através do método de purificação sugerido por Sperandio (1982), com modificações. Aproximadamente 100 gramas de folhas de rúcula com sintomas foram trituradas em liquidificador com solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (2 ml de tampão para cada grama de folha). Adicionou-se durante a trituração 1% de sulfito de sódio e 0,01M de EDTA. Com o auxílio de gaze duplo, o triturado foi filtrado e mantido sob baixa temperatura (gelo). Sob agitação, adicionou-se à solução filtrada 25% do volume inicial de clorofórmio e 25% do volume inicial de butanol, permanecendo sob agitação por 10 minutos, em câmara fria.

O material foi centrifugado durante 10 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante recolhido. Acrescentou-se então 8% do volume inicial de PEG 8000, sob agitação por uma hora, em câmara fria. Uma nova centrifugação foi realizada a 11000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 20% do volume inicial em tampão fosfato de sódio 0,1M, sob agitação por uma noite a 10° C.

Uma nova centrifugação foi realizada, durante 10 minutos a 13000 rpm, e o sobrenadante recolhido e submetido a uma alta centrifugação a 43000 rpm por duas horas, a 4° C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspenso em 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,01M sob agitação em câmara fria por uma noite. Um colchão de sacarose a 30% foi feito com o material ressuspenso na etapa anterior e submetido a uma alta centrifugação a 48000 rpm por 2:30 horas. O *pellet* foi ressuspenso em 600 µl de tampão fosfato de sódio 0,01M e

centrifugado a 10000 g por 15 minutos, sob refrigeração. O sobrenadante foi então recolhido e com o mesmo realizou-se um gradiente de sacarose a 20% congelado, que foi centrifugado a 38000 rpm durante uma hora e meia, a 4° C. O material foi fracionado com o auxílio do fracionador de gradiente ISCO, com o leitor ajustado a 245 µm, o que deu origem a um gráfico. Após ter sido separado na etapa anterior, o material foi centrifugado a 48000 rpm por 2:30 horas, a 4° C. O *pellet* foi ressuspendido em 300 µl de tampão fosfato de sódio 0,01M.

## **12. Determinação da massa molecular das proteínas capsidiais do TuRSV-PR**

As amostras foram preparadas com 10 µl do vírus purificado, juntamente com 20 µl de tampão de corrida, deixadas a 100° C em banho-maria por 5 minutos.

Um gel separador 12,5% foi feito com 3,42 ml de água destilada; 1,07 ml tampão Tris-HCl pH 8,8; 0,07 ml SDS 10%; 3,55 ml Bis-acrilamida; 10 µl Temed; e 0,375 ml persulfato de amônio 1,5%. Este gel foi colocado na placa de eletroforese, previamente preparada, até a sua polimerização. Um segundo gel (concentrador a 3,75%) foi preparado com 2,82 ml de água destilada; 1,25 ml tampão Tris-HCl pH 6,8; 0,05 ml SDS 10%; 0,62 ml Bis-acrilamida; 10 µl Temed; e 0,25 ml persulfato de amônio 1,5%. Este segundo gel foi aplicado sobre o primeiro, juntamente com o pente contendo os poços, até a polimerização. A placa de vidro foi então colocada na cuba, em seguida colocou-se o tampão de corrida Tris-glicina pH 8,3 1X. As amostras foram aplicadas nas quantidades de 5, 10 e 15 µl por poço e o marcador nas quantidades de 5 e 10 µl por poço. O gel correu a uma voltagem de 60 V, até que o corante das amostras chegasse ao final da placa. O gel foi corado em solução corante por aproximadamente 30 minutos e em seguida, mantido em solução descorante por aproximadamente uma hora, até que ficasse bem visível.

O marcador utilizado no gel foi o Low Molecular Weight Calibration Kit (Amersham Biosciences®), contendo as seguintes proteínas com massa molecular específicos: Fosforilase b (97,0 kDa); Albumina (66,0 kDa); Ovoalbumina (45,0



kDa); Carbonic anhydrase (30,0 kDa); Trypsin inhibitor (20,1 kDa);  $\alpha$ -Lactoalbumina (14,4 kDa).

### 13. Clonagem dos produtos das ampliações por RT-PCR

A reação de ligação do produto de PCR amplificado com o plasmídeo foi feita utilizando-se o kit pGem-T Easy Vector Systems<sup>®</sup>. Utilizou-se 1  $\mu$ l de água DEPC (0,01%), juntamente com 5  $\mu$ l de 2X Rapid Ligation Buffer; 2  $\mu$ l do produto de PCR; 1  $\mu$ l de pGem-T Easy Vector (50 ng); 1  $\mu$ l de T4 DNA Ligase, chegando-se a um volume final de 10  $\mu$ l. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por uma hora.

A transformação foi feita por choque térmico, utilizando-se bactérias competentes *Escherichia coli*, cepa DH5 $\alpha$ . As bactérias foram descongeladas no gelo por aproximadamente 10 minutos. Em um tubo de eppendorf, pipetou-se 50  $\mu$ l de bactérias, juntamente com 2  $\mu$ l de DNA ligado ao plasmídeo. A suspensão foi misturada por 2 vezes e mantida no gelo por 30 minutos. O choque térmico foi realizado incubando-se os tubos por 2 minutos a 42° C e depois mantidos por 2 minutos no gelo. Adicionou-se 450  $\mu$ l de meio SEC (1 ml de meio LB líquido; 10  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1M; 10  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 1M; 20  $\mu$ l de glicose 1M) e a mistura foi incubada por uma hora a 37° C, sob leve agitação.

Um meio de seleção foi preparado com 20 ml de meio sólido LB, 40  $\mu$ l de X-gal (20 mg/ml), 200  $\mu$ l de ampicilina (5 mg/ml) e 7  $\mu$ l de IPTG (200 mg/ml). Este meio foi vertido em placa de Petri, e após solidificação, aplicou-se com o auxílio de uma alça de Drigalski, 50  $\mu$ l da solução de transformação. O restante do meio contendo as bactérias foi centrifugado por 2 minutos a 4000 rpm, ressuspendido em 50  $\mu$ l e plaqueado em uma nova placa. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37° C, por 16 horas.

Devido ao fato de que o meio presente nas placas conter ampicilina, somente as bactérias transformadas contendo os plasmídios crescem, pois é no plasmídeo que se encontra o gene de resistência à ampicilina.

As colônias foram selecionadas de acordo com a coloração apresentada. As colônias de bactérias que apresentaram coloração branca, indicando que houve o inserto no plasmídio, foram retiradas do meio com auxílio de um palito autoclavado e colocadas em 5 ml de meio líquido LB, contendo 50 µl de ampicilina. Os tubos foram incubados a 37° C sob agitação por 16 horas.

Uma solução estoque de cada cultura de bactérias competentes transformadas foi feita para conserva, utilizando-se 150 µl de glicerol e 850 µl da cultura, estocadas a -80° C.

A extração do plasmídio da bactéria foi feita utilizando-se o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega®). As bactérias foram concentradas através de uma centrifugação dos tubos a 4000 rpm por 5 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do precipitado em 600 µl da solução descartada. Cada colônia foi transferida para um micro-tubo de 1,5 ml, e em seguida adicionou-se 100 µl de Cell Lysis Buffer e misturou-se invertendo o tubo por 6 vezes (a solução passou de opaca para azul claro, indicando a completa lise). Foi adicionado ao tubo 350 µl de Neutralization Solution (4° C), onde foi misturado invertendo-se o tubo por algumas vezes, até que a mistura ficasse amarela indicando a completa neutralização. Os tubos foram centrifugados na máxima rotação (14000 rpm) por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para as micro-colunas e estas foram colocadas em novos tubos e centrifugadas na máxima rotação por 15 segundos. O sobrenadante foi descartado e as micro-colunas foram colocadas nos mesmos tubos. Adicionou-se 200 µl de Endotoxin Removal Wash na micro-coluna e centrifugou-se a 14000 rpm por 15 segundos. Em seguida, foram pipetados 400 µl de Column Wash Solution na micro-coluna e realizou-se uma centrifugação por 30 segundos. As micro-colunas foram transferidas para novos tubos de eppendorf e então adicionou-se 30 µl de Elution Buffer e as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por um minuto. Os tubos juntamente com as micro-colunas foram centrifugados em máxima rotação por 15 segundos para eluir o DNA plasmidial, em seguida os tubos foram armazenados a -20°C.

Novas reações de PCR foram feitas, com o produto da extração do DNA plasmidial, utilizando-se os mesmos *primers* e o mesmo protocolo que foram utilizados na amplificação inicial, a fim de se analisar a presença das bandas com tamanho semelhante ao esperado nas amplificações do PCR anterior.

As reações de digestão para linearizar o plasmídio foram feitas com 11 µl de DNA pasmidial (Miniprep), 2 µl de RE 10X Buffer (J), 0,2 µl de BSA, 0,5 µl da enzima SacI e 6,3 µl de água DEPC (0,01%), chegando-se a um volume final de 20 µl. As reações foram incubadas a 37° C (temperatura ótima para a enzima) por um período de 4 horas.

#### **14. Sequenciamento dos produtos de amplificação por RT-PCR**

As amostras de DNA preparadas acima foram submetidas a uma eletroforese, em gel de agarose a 0,8%, utilizando como marcador o Lambda HindIII (Promega®), para estimar a concentração do DNA no plasmídio digerido.

A concentração desejável do plasmídio é de 100 ng/µl, em função de seu tamanho (vetor + inserto) de aproximadamente 4 kb.

As amostras para sequenciamento foram enviadas ao Setor de Sequenciamento de DNA, no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, juntamente com a foto do gel utilizado para a quantificação. Em cada micro-tubo de 200 µl foram colocados 5 µl do DNA, juntamente com 2,5 µl de *primer* (5 µM). O sequenciamento do DNA foi feito a partir dos plasmídios utilizando o sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems®), com 48 capilares. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit. As corridas foram realizadas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

#### **15. Análise filogenética comparativa do TuRSV-PR com outros Comovirus**

As sequências de nucleotídeos referentes ao genoma parcial do RNA 1 e do RNA 2 do vírus em estudo obtidas por sequenciamento foram analisadas

através do software Chromas Lite e comparadas com sequências de *Comovirus* relacionadas disponíveis no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)), através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o programa Clustal W ([www.ebi.ac.uk/Clustalw](http://www.ebi.ac.uk/Clustalw)). As sequências de nucleotídeos obtidas foram traduzidas para aminoácidos com o auxílio do programa ExPASy (<http://expasy.org/>) e novos alinhamentos e comparações foram feitos para o RNA 1 e para o RNA 2. A partir dos alinhamentos, foram geradas árvores filogenéticas baseadas na sequência de aminoácidos do RNA 1 e do RNA 2 dos comovírus utilizando-se para isso o programa MEGA 4.1 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)), através do método de “Neighbor-Joining” (NJ). Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap* com 1000 repetições.

Ainda com o auxílio do programa MEGA 4.1, calculou-se as distâncias evolucionárias entre estes vírus, baseadas nas sequências de aminoácidos utilizadas para a elaboração das árvores. O modelo estatístico utilizado foi o *p-distance*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Determinação da gama de hospedeiras

Das 52 espécies botânicas inoculadas, apenas 5 espécies desenvolveram sintomas, pertencentes às famílias *Amaranthaceae*, *Brassicaceae* e *Solanaceae*, conforme mostra a Tabela 1.

Dentre as espécies que apresentaram sintomas, as duas variedades de rúcula (*Eruca sativa*) testadas (Cultivada e Folha larga) apresentaram deformação foliar, embolhamento e mosaico, além de apresentar uma significativa diminuição no porte da planta (Figura 2). Plantas de *Chenopodium amaranticolor* apresentaram lesão local clorótica (Figura 3). O nabo-redondo e a couve-chinesa (*Brassica rapa*) apresentaram embolhamento, mosaico e manchas anelares (Figura 3). O rabanete (*Raphanus sativus* var. *acanthiformis* Minowase) apresentou sintomas de mosaico (Figura 3). Plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas desenvolveram sintomas de mancha anelar e clorose (Figura 3). Todos os sintomas observados apareceram entre 15 e 20 dias após a inoculação. Exceto os sintomas em *Chenopodium amaranticolor*, todos os outros sintomas desenvolveram-se de forma sistêmica nas plantas cujas reações sintomáticas foram positivas.

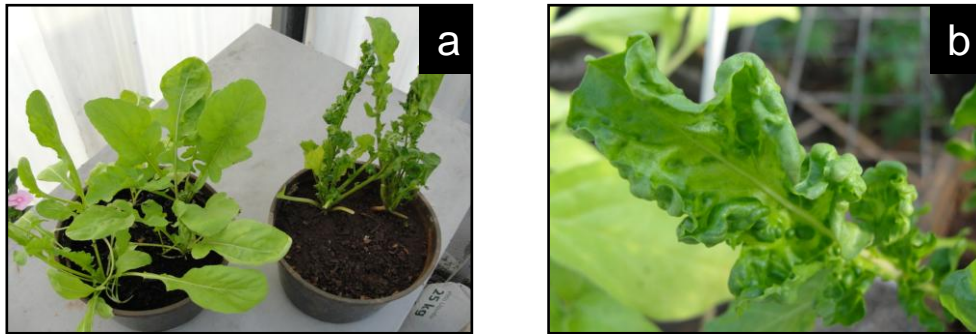
**Tabela 1** Gama de hospedeiras do isolado paranaense do *Turnip ringspot virus* (TuRSV-PR)

<b>Espécie</b>	<b>Sintomas</b>
<b>Família Amaranthaceae (Chenopodiaceae)</b>	
<i>Beta vulgaris</i>	-
<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Llc
<i>Chenopodium quinoa</i>	-
<i>Gomphrena globosa</i>	-
<i>Spinacea oleracea</i>	-
<b>Família Asteraceae</b>	
<i>Cichorium intybus</i>	-
<i>Helianthus annuus</i>	-
<i>Lactuca sativa</i> (americana)	-
<i>Lactuca sativa</i> (lisa)	-
<b>Família Apocynaceae</b>	
<i>Catharanthus roseus</i>	-
<b>Família Brassicaceae (Cruciferaeae)</b>	
<i>Brassica alba</i>	-
<i>Brassica juncea</i>	-
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	-
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	-
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	-
<i>Brassica rapa</i> (nabo redondo)	Em, Mo
<i>Brassica rapa</i> (couve-chinesa)	Mo, Ma
<i>Eruca sativa</i> (cultivada)	Df, Em, Mo
<i>Eruca sativa</i> (folha larga)	Df, Em, Mo
<i>Nasturtium officinalis</i>	-
<i>Raphanus sativus</i>	-
<i>Raphanus sativus</i> var. <i>acanthiformis</i> (Minowase)	Mo
<b>Família Cucurbitaceae</b>	
<i>Citrullus lanatus</i>	-
<i>Cucumis sativus</i>	-
<i>Cucumis sativus</i> (caipira verde)	-
<i>Cucumis sativus</i> (twister)	-
<i>Cucumis sativus</i> (híbrido Guarani)	-
<i>Cucurbita maxima</i>	-
<i>Cucurbita moschata</i> (caravela)	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> (rosinha)	-
<i>Vigna unguiculata</i>	-
<b>Família Solanaceae</b>	
<i>Capsicum annuum</i>	-
<i>Datura stramonium</i>	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-
<i>Nicandra physaloides</i>	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Ma, Cl
<i>Nicotiana debney</i>	-
<i>Nicotiana occidentalis</i>	-

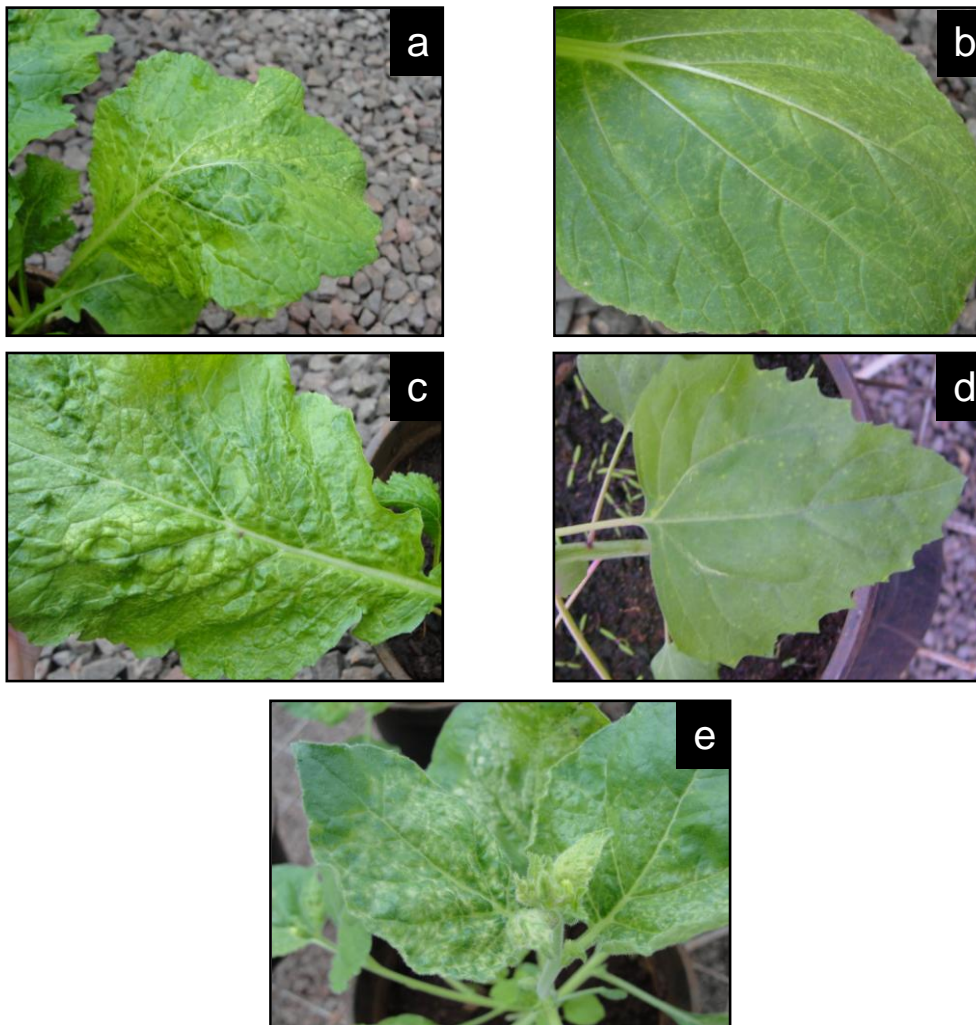
**Tabela 1, Cont.**

<b>Espécie</b>	<b>Sintomas</b>
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>TNN</i>	-
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>samsun</i>	-
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>Xanti</i>	-
<i>Petunia integrifolia</i>	-
<i>Solanum melongena</i>	-
<b>Família Lamiaceae</b>	
<i>Salvia officinalis</i>	-
<b>Família Alliaceae</b>	
<i>Allium cepa</i>	-

Onde: Cl: clorose, Df: deformação foliar, Em: embolhamento, Lln: lesão local clorótica, Ma: mancha anelar, Mo: mosaico e -: ausência de sintomas.



**Figura 2** Sintomas de infecção viral do TuRSV-PR em rúcula, evidenciando sintomas de redução de porte da planta (a); e deformação foliar, embolhamento e mosaico (b).



**Figura 3** Sintomas de infecção viral do TuRSV-PR em folhas de rabanete da cultivar Minowase (a); couve-chinesa (b); nabo redondo (c); *Chenopodium amaranticolor* (d); e *Nicotiana benthamiana* (e).



O isolado paranaense do TuRSV, como o isolado M12 da Rússia (Koloniuk et al., 2008) e o isolado Toledo dos Estados Unidos (Khandekar et al., 2009) deste vírus, desenvolveu sintomas em plantas de couve-chinesa e nabo. Porém estas plantas, quando inoculadas com o TuRSV-PR apresentaram sintomas de mosaico, manchas anelares e embolhamento, ao passo que para os isolados americano e russo, os sintomas descritos são de manchas anelares cloróticas e padrões de linhas em couve-chinesa e em nabo.

Koloniuk et al. (2008), também relataram sintomas de infecção viral do isolado M12 do TuRSV (Rússia) em mostarda branca. O isolado de TuRSV em estudo não desenvolveu sintomas neste vegetal quando inoculado mecanicamente.

Segundo Koloniuk & Petrzik (2009), o isolado B do TuRSV, da Croácia, desenvolveu sintomas em plantas de couve-flor. Já as plantas de couve-flor inoculadas mecanicamente com o isolado estudado não desenvolveram sintomas.

Os dados obtidos por testes de gama de hospedeiras, quando comparados com os resultados descritos na literatura, sugerem que o isolado do TuRSV do Paraná possa ser uma estirpe diferente daquelas já relatadas, pois existem algumas diferenças nas espécies vegetais infectadas e nos sintomas causados nestas plantas.

## **2. Determinação das propriedades físicas *in vitro* do TuRSV-PR**

Amostras inoculadas com o tratamento de 60 °C desenvolveram sintomas, ao passo que amostras inoculadas com o tratamento de 65 °C não desenvolveram, evidenciando que o Ponto de Inativação Térmica deste isolado é de 65° C. Este valor está próximo aos valores apresentados por Brunt et al. (1996) para outras espécies de comovírus como o *Bean rugose mosaic virus*, *Cowpea mosaic virus*, *Cowpea severe mosaic virus*, *Andean potato mottle virus*, e *Radish mosaic virus*.

A diluição máxima em que o extrato bruto se manteve infectivo foi observado na diluição de 10<sup>-3</sup>. O ponto de diluição final da maioria dos comovírus varia entre 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> (Brunt et al., 1996).

A longevidade *in vitro* deste isolado foi de 28 dias. Resultados semelhantes são descritos para o *Andean potato mottle virus* e *Squash mosaic virus*, ao passo que o *Radish mosaic virus*, espécie mais próxima do *Turnip ringspot virus*, possui longevidade de 14-21 dias (Brunt et al., 1996).

Não há relatos na literatura sobre as propriedades *in vitro* do TuRSV.

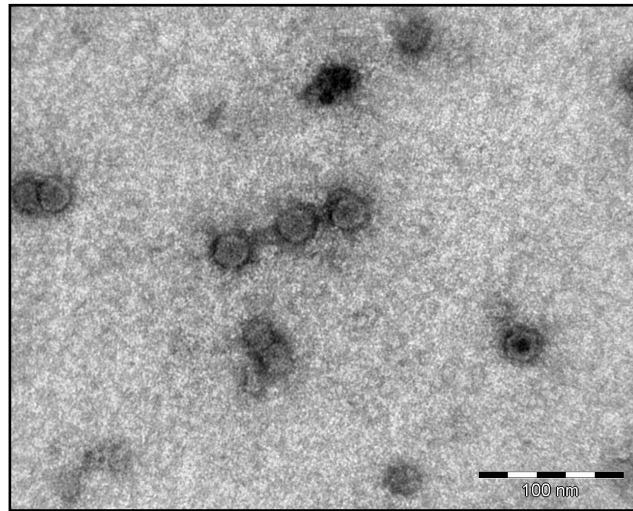
### **3. Teste de transmissão por sementes do TuRSV-PR**

Do total de 437 sementes plantadas, apenas 283 germinaram e puderam ser avaliadas. Nenhuma das plantas provenientes de sementes de plantas infectadas desenvolveu sintomas no período em que foram observadas.

Possivelmente, o TuRSV-PR não seja transmitido por sementes, da mesma forma que o RaMV, BPMV (*Bean pod mottle virus*), BRMV (*Bean rugose mosaic virus*) (Brunt et al., 1996), e outros comovirus que também não são transmitidos desta maneira. Porém, os mesmos autores citam que outras espécies de *Comovirus* podem ser transmitidas por sementes, como o CPMV (*Cowpea mosaic virus*), CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*) e o SqMV (*Squash mosaic virus*). Na literatura pesquisada, não foram encontrados relatos deste tipo de transmissão para o TuRSV.

### **4. Exames de microscopia eletrônica de plantas infectadas pelo TuRSV-PR**

Exames de microscopia eletrônica a partir de folhas infectadas de rúcula e de *N. benthamiana* revelaram a presença de partículas isométricas, com diâmetro variando entre 25-30 nm (Figura 4).

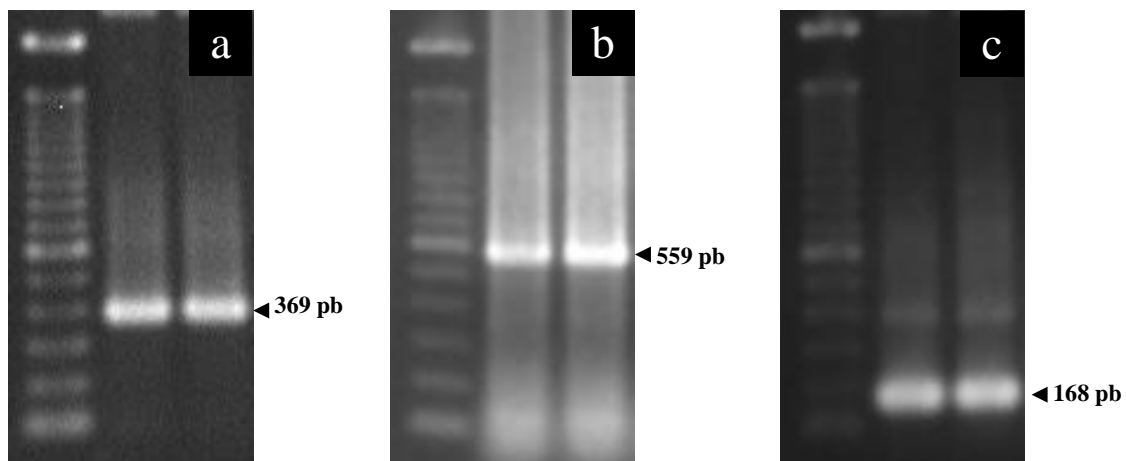


**Figura 4** Fotografia de microscopia eletrônica de transmissão de preparações de folhas de rúcula infectadas, através do método de imersão foliar – *Leaf dip* (Realizado pelo Prof. Dr. Kitajima, E. W).

Rajakaruna et al. (2007) encontraram em plantas infectadas com o TuRSV, partículas virais icosaédricas de tamanho aproximado de 28 nm. Zein & Shafie (2005) relataram a presença de partículas isométricas com diâmetro de 35 nm, em plantas de rúcula infectadas com o RaMV. Brunt et al. (1996) citam que as partículas virais do RaMV possuem forma isométrica, com diâmetro aproximado de 33 nm.

### **5. Amplificação por RT-PCR dos RNAs virais**

Após as amplificações, os produtos de PCR foram avaliados em eletroforese sob luz UV e as amostras de plantas inoculadas com o isolado em estudo apresentaram bandas correspondentes a 369 pb e 519 pb para o RNA 1 e 168 pb para o RNA 2, conforme Figura 5. As amostras consideradas controle negativo, ou seja, não inoculadas, não apresentaram bandas nos géis.



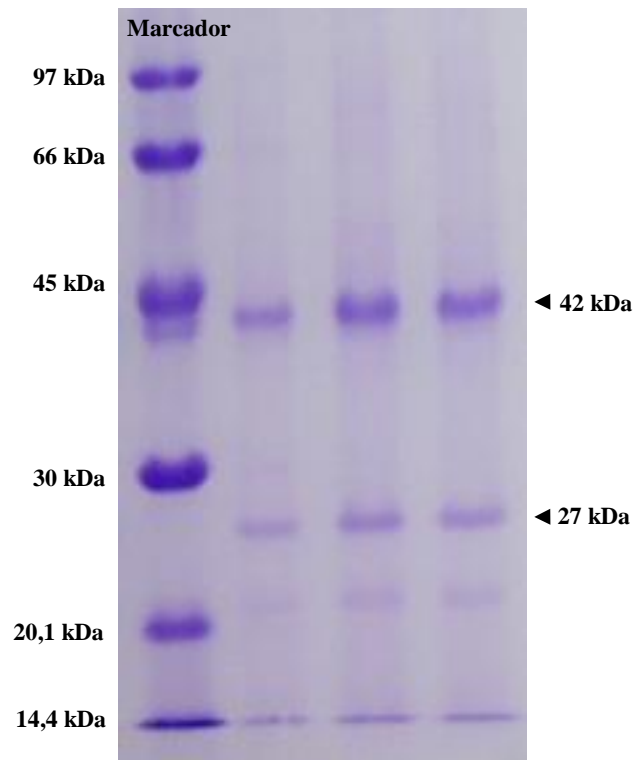
**Figura 5** Produto de RT-PCR em gel de agarose, mostrando ampliações de 369 pb do RNA 1, utilizando os *primers* TuRSV RNA1 1F e TuRSV RNA1 2R descritos por Rajakaruna et al. (2007) (a), 559 pb do RNA 1, utilizando os *primers* RNA1 Rúcula Foward e RNA1 Rúcula Reverse descritos neste trabalho (b), e 168 pb do RNA 2, realizado com os *primers* TuRSV RNA2 1F e TuRSV RNA2 2R de Rajakaruna et al. (2007) (c).

Conforme observado na Figura 5, tanto os *primers* que amplificam 369 pb do RNA 1 quanto os *primers* que amplificam 168 pb do RNA 2, utilizados por Rajakaruna et al. (2007), resultaram em ampliações de bandas do tamanho esperado. Os mesmos autores citam que os *primers* que amplificam o fragmento do RNA 2, podem se anelar no genoma do TuRSV como também no genoma do RaMV, detectando assim, plantas infectadas com quaisquer destes vírus. Porém, o par de *primers* que amplifica o fragmento do RNA 1 anela-se somente no genoma do TuRSV, não resultando em ampliações para o RaMV. Desta forma, pode-se inferir que o isolado viral em estudo é o TuRSV e não o RaMV.

## 6. Determinação da massa molecular das proteínas capsidiais do TuRSV-PR

Após a purificação viral, pode-se observar em gel de poliacrilamida (Figura 6), a presença de várias bandas, de massa molecular de 42, 27, 21 e 18 kDa. Resultados parecidos foram observados por Khandekar et al. (2009) para o TuRSV, cujas bandas apresentavam massa molecular de 29 kDa (SCP) e 41 kDa (LCP). Koloniuk & Petrzik (2009) relataram a presença de bandas de massa

molecular de 28 e 41 kDa (SCP e LCP) para o TuRSV. Possivelmente, as bandas de 27 e 42 kDa correspondem, respectivamente à massa molecular das proteínas SCP e LCP do isolado do TuRSV em estudo.



**Figura 6** Gel de poliacrilamida para determinação da massa molecular das proteínas capsidiais do TuRSV-PR, mostrando bandas correspondentes a 27 kDa (*Small coat protein*) e 42 kDa (*Large coat protein*).

Rajakaruna et al. (2007), em análise das proteínas capsidiais do isolado de Toledo do TuRSV, detectaram a presença de várias bandas protéicas que foram mais proeminentes nas amostras infectadas do que nas amostras sadias, mas nem todas as bandas observadas continham polipeptídeos virais. A banda de 40 kDa observada por estes autores correspondiam à proteína capsidial do TuRSV, porém nenhuma banda de peso molecular aproximado de 20 kDa referente à SCP do TuRSV foi observada.

Zein & Shaife (2005), encontraram quatro bandas em gel de proteína ao analisarem o RaMV. Estas bandas correspondiam à massa molecular de 76, 55,

43 e 35 kDa. Koenig & Fisher (1981) citam que as proteínas podem se degradar parcialmente *in vivo* e *in vitro*, resultando em proteínas de menor massa molecular quando observadas em gel de poliacrilamida.

#### **7. Sequenciamento e análise filogenética comparativa do TuRSV-PR com outros *Comovirus***

Após a clonagem e o sequenciamento dos produtos de PCR obtidos, foram feitas comparações entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas e aquelas depositadas no GenBank. Quando comparadas com as sequências de nucleotídeos, o fragmento de 917 pb referente à região C-terminal do RNA 1 (fragmento correspondente às regiões amplificadas pelos dois pares de *primers* utilizados para a obtenção das sequências parciais do RNA 1) apresentou 81% de similaridade genética com o isolado de Toledo (EUA) e M12 (Rússia) do TuRSV e 78% de similaridade com o isolado B do TuRSV (Croácia). Quando comparado com outros vírus do mesmo gênero, este fragmento apresentou 65% de similaridade com os isolados do Japão e da Califórnia do RaMV, 71% com o *Cowpea severe mosaic virus*, 74% com o *Red clover mottle virus*, 69% com o *Bean pod mottle virus* e 68% com o *Squash mosaic virus*. O fragmento de 168 pb amplificado do RNA 2 do isolado em estudo apresentou 83% de identidade com o isolado de Toledo e com o isolado HZ (República Tcheca) do TuRSV, 80% de identidade com o isolado M12 e 78% com o isolado B do TuRSV. Quando comparado com o RaMV, este fragmento apresentou identidade de 75% (dados não apresentados).

Após a tradução das sequências de nucleotídeos em aminoácidos, realizou-se uma nova comparação com as sequências do GenBank, tanto para o fragmento do RNA 1 (307 aminoácidos) quanto para o fragmento do RNA 2 (55 aminoácidos), os resultados encontram-se nas Tabelas 2 e 3 a seguir.

**Tabela 2** Similaridade genética dos *Comovirus* que apresentaram homologia com a sequência parcial de aminoácidos da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1) do TuRSV-PR.

<b>Vírus</b>	<b>Número de acesso GenBank</b>	<b>Local</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Similaridade com o TuRSV-PR</b>
<i>Andean potato mottle virus</i> (APMoV)	AAA42422	Brasil	-	37%
<i>Bean pod mottle virus</i> (BPMV)	AAM73715	EUA	-	44%
<i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)	NP_613283	-	-	41%
<i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV)	NP_734062	-	-	40%
<i>Radish mosaic virus</i> (RaMV)	ACE06773	Republica Tcheca	-	68%
<i>Red clover mottle virus</i> (RCMV)	NP_620468	Reino Unido	-	45%
<i>Squash mosaic virus</i> (SqMV)	NP_734012	Japão	-	40%
<i>Turnip ringspot virus-M12</i> (TuRSV-M12)	ACX53644	Rússia	Couve-chinesa	88%
<i>Turnip ringspot virus-Toledo</i> (TuRSV-To)	YP_003193665	EUA	-	88%
<i>Turnip ringspot virus-B</i> (TuRSV-B)	ACX53646	Croácia	Couve-flor	86%

- dados indisponíveis

Como pode ser observado na Tabela 2, o fragmento do RNA 1 do isolado do Paraná do TuRSV apresenta maior similaridade genética com os isolados Toledo e M12 tanto quando analisadas as sequencias a nível de nucleotídeos, como também a nível de aminoácidos, seguidos pelo isolado B, cuja similaridade foi um pouco mais baixa. Quando se refere ao fragmento do RNA 2, (Tabela 3) a sequência de nucleotídeos mostra que este isolado apresenta maior similaridade com os isolados de Toledo e da Republica Tcheca, seguidos dos isolados M12 e B. Já na comparação feita com a sequência de aminoácidos, este mesmo fragmento apresentou a mesma porcentagem de identidade com os isolados de Toledo, M12 e HZ, e menor identidade com o isolado B.

A região que codifica a LCP é a região mais conservada do RNA 2, mostrando uma identidade que varia entre 78% para o RaMV e 43% para o CPSMV, quando comparados com o isolado do TuRSV do Toledo (Khandekar,

et al., 2009). O isolado em estudo apresentou uma similaridade de 86% com o RaMV e 46% com o CPSMV. A identidade mais baixa deste isolado, quando comparada a sequência estudada com outros comovírus, foi com o BPMV (43%).

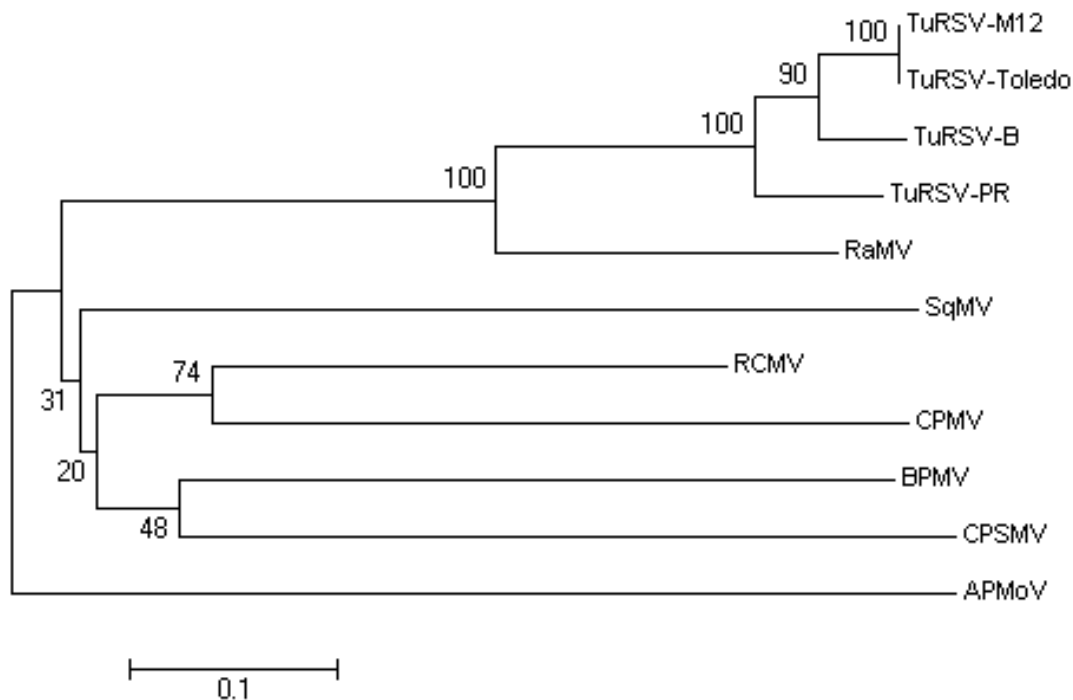
**Tabela 3** Similaridade genética dos *Comovirus* que apresentaram homologia com a sequência parcial de aminoácidos da *Large coat protein* (RNA 2) do TuRSV-PR.

<b>Vírus</b>	<b>Número de acesso GenBank</b>	<b>Local</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Similaridade com o TuRSV-PR</b>
<i>Andean potato mottle virus</i> (APMoV)	AAA42423	-	-	-
<i>Bean pod mottle virus</i> (BPMV)	AAM73720	EUA	-	43%
<i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)	CAA25317	-	-	46%
<i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV)	NP_734064	-	-	46%
<i>Radish mosaic virus</i> (RaMV)	ACS12878	Republica Tcheca	-	86%
<i>Red clover mottle virus</i> (RCMV)	ACS12872	Republica Tcheca	-	48%
<i>Squash mosaic virus</i> (SqMV)	ABI26628	China	Abóbora	52%
<i>Turnip ringspot virus-M12</i> (TuRSV-M12)	ACX53645	Republica Tcheca	Couve-chinesa	97%
<i>Turnip ringspot virus-Toledo</i> (TuRSV-To)	YP_003193666	EUA	-	97%
<i>Turnip ringspot virus-B</i> (TuRSV-B)	ACX53647	Croácia	Couve-flor	95%
<i>Turnip ringspot virus-HZ</i> (TuRSV-HZ)	ACS12876	Croácia	-	97%

- dados indisponíveis

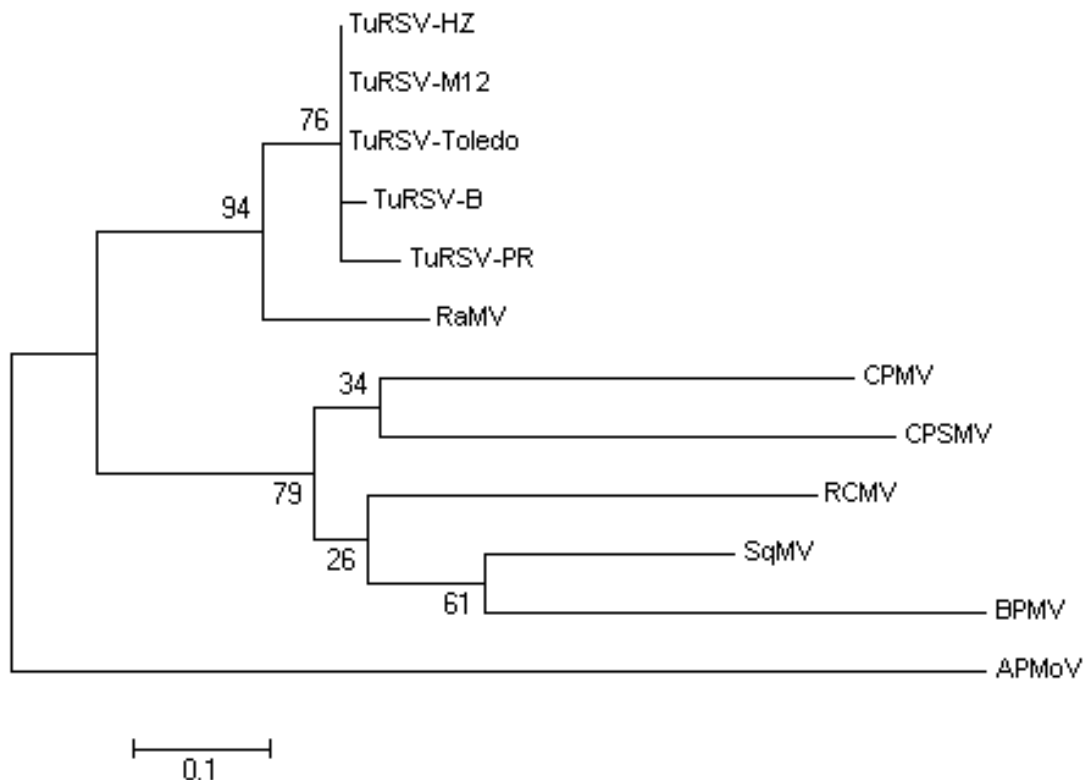
As árvores filogenéticas referentes aos fragmentos do TuRSV-PR, comparados com outros comovírus encontram-se a seguir (Figura 7 e Figura 8).





**Figura 7** Árvore filogenética dos comovírus baseada na comparação da sequência de aminoácidos parcial da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1). Abreviações e número de acesso do GenBank: APMoV, *Andean potato mottle virus*, AAA42422; BPMV, *Bean pod mottle virus*, AAM73715; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, NP\_613283; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NP\_734062; RaMV, *Radish mosaic virus*, ACE06773; RCMV, *Red clover mottle virus*, NP\_620468; SqMV, *Squash mosaic virus*, NP\_734012; TuRSV-M12, *Turnip ringspot virus*, isolado M12, ACX53644; TuRSV-Toledo, *Turnip ringspot virus*, isolado Toledo, YP\_003193665; TuRSV-B, *Turnip ringspot virus*, isolado B, ACX53646; TuRSV-PR, *Turnip ringspot virus*, isolado Paraná.

Ao analisarmos a árvore filogenética resultante da comparação entre a sequência parcial do RNA 1 do TuRSV-PR com os demais *Comovirus* (Figura 7), fica claro que os isolados M12 e Toledo estão mais relacionados entre si quando comparados com os demais isolados do mesmo vírus, seguidos pelo isolado B. O isolado paranaense, embora um pouco mais afastado, forma um mesmo clado com os demais isolados deste vírus. Todos os isolados do TuRSV, e também o RaMV, formam um ramo separado dos demais comovírus, embora estes dois vírus sejam considerados espécies distintas.



**Figura 8** Árvore filogenética dos comovírus baseada na comparação da sequência de aminoácidos parcial da *Large coat protein* (RNA 2). Abreviações e número de acesso do GenBank: APMoV, *Andean potato mottle virus*, AAA42423; BPMV, *Bean pod mottle virus*, AAM73720; CPMV, *Cowpea mosaic virus*, CAA25317; CPSMV, *Cowpea severe mosaic virus*, NP\_734064; RaMV, *Radish mosaic virus*, ACS12878; RCMV, *Red clover mottle virus*, ACS12872; SqMV, *Squash mosaic virus*, ABI26628; TuRSV-M12, *Turnip ringspot virus*, isolado M12, ACX53645; TuRSV-Toledo, *Turnip ringspot virus*, isolado Toledo, YP\_003193666; TuRSV-B, *Turnip ringspot virus*, isolado B, ACX53647; TuRSV-HZ, *Turnip ringspot virus*, isolado HZ, ACS12876; TuRSV-PR, *Turnip ringspot virus*, isolado Paraná.

A árvore representada pela Figura 8 evidencia que os isolados HZ, M12 e Toledo do TuRSV apresentam a mesma conformação na *Large coat protein*, a nível de aminoácidos. Já o isolado B, apresenta uma pequena diferença quando comparado com os anteriores. O TuRSV-PR formou um mesmo ramo com os demais isolados deste vírus, porém com uma distância um pouco maior entre eles. Da mesma forma que na árvore referente ao RNA 1, nesta árvore, o RaMV forma um galho junto com os isolados do TuRSV, separado dos demais comovírus.

Resultados semelhantes, para as duas árvores, foram relatados por Rajakaruna et al. (2007) e por Khandekar et al. (2009), em que o TuRSV e o RaMV formaram seu próprio subgrupo dentro do gênero *Comovirus*.

As distâncias evolucionárias calculadas para estes vírus estão representadas pelas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** Distâncias evolucionárias dos comovírus baseada na comparação da sequência de aminoácidos parcial da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1).

	TuRSV- PR	TuRSV- M12	TuRSV- To	TuRSV- B	RaMV	SqMV	CPMV	RCMV	CPSMV	BPMV	APMoV
TuRSV- PR											
TuRSV- M12	0.12										
TuRSV- To	0.12	0.00									
TuRSV-B	0.14	0.08	0.08								
RaMV	0.30	0.31	0.31	0.29							
SqMV	0.55	0.56	0.56	0.56	0.53						
CPMV	0.56	0.56	0.56	0.56	0.53	0.55					
RCMV	0.51	0.49	0.49	0.51	0.51	0.53	0.44				
CPSMV	0.55	0.57	0.57	0.56	0.55	0.56	0.53	0.54			
BPMV	0.55	0.55	0.55	0.56	0.57	0.54	0.53	0.50	0.51		
APMoV	0.58	0.58	0.58	0.60	0.56	0.60	0.60	0.55	0.60	0.56	

Após análises dos dados mostrados na Tabela 4, evidencia-se que o isolado paranaense do TuRSV, quando comparado pelo RNA 1, possui uma distância evolucionária menor com os isolados TuRSV-M12 e TuRSV-Toledo, seguido pelo TuRSV-B. Os isolados de Toledo e M12 são estatisticamente semelhantes entre si.

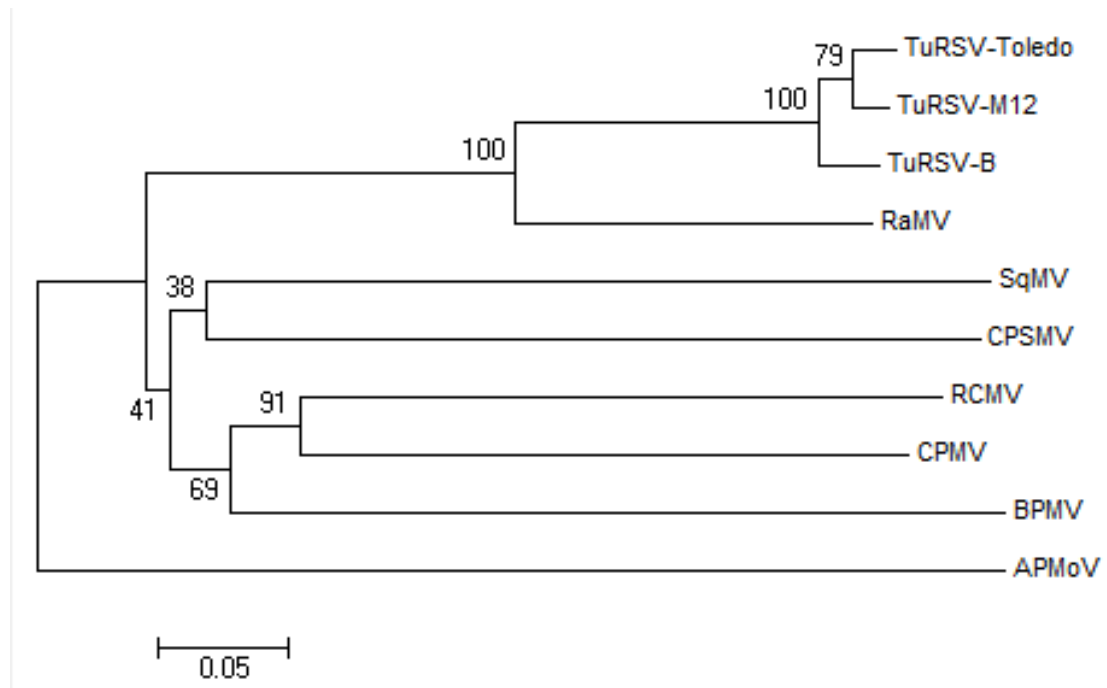
**Tabela 5** Distâncias evolucionárias dos comovírus baseada na comparação da sequência de aminoácidos parcial da *Large coat protein* (RNA 2).

	TuRSV -PR	TuRSV -HZ	TuRSV -To	TuRSV -M12	TuRSV -B	RaMV	SqMV	CPMV	RCMV	CPSM V	BPMV	APMo V
TuRSV- PR												
TuRSV- HZ	0.04											
TuRSV- To	0.04	0.00										
TuRSV- M12	0.04	0.00	0.00									
TuRSV- B	0.06	0.02	0.02	0.02								
RaMV	0.17	0.17	0.17	0.17	0.19							
SqMV	0.50	0.46	0.46	0.46	0.46	.052						
CPMV	0.54	0.50	0.50	0.50	0.52	0.52	0.61					
RCMV	0.54	0.50	0.50	0.50	0.52	0.57	0.46	0.52				
CPSMV	0.56	0.54	0.54	0.54	0.56	0.56	0.50	0.52	0.56			
BPMV	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.43	0.57	0.54	0.56		
APMoV	0.65	0.61	0.61	0.61	0.61	0.65	0.69	0.76	0.72	0.78	0.74	

Ao analisarmos as sequências correspondentes ao RNA 2 (Tabela 5), conclui-se que os isolados M12, Toledo e HZ do TuRSV são estatisticamente semelhantes. Estes, por sua vez, estão a uma distância evolucionária mais próxima do TuRSV-B. Sob este aspecto, o isolado TuRSV-PR possui uma distância evolucionária de 0,04 com os três isolados estatisticamente semelhantes e uma distância de 0,06 com o TuRSV-B. Portanto, o isolado paranaense está mais próximo dos isolados M12, Toledo e Hz, quando comparado com o TuRSV-B.

As análises filogenéticas realizadas neste trabalho, juntamente com os resultados obtidos através da determinação da gama de hospedeira, evidenciam que o isolado em estudo pode ser uma estirpe do TuRSV diferente daquelas já sequenciadas e descritas na literatura.

Uma nova árvore (Figura 9) e um novo cálculo das distâncias evolucionárias (Tabela 6) foram feitos levando-se em consideração a sequência completa de aminoácidos da RdRp presente no RNA 1 dos *Comovirus*.

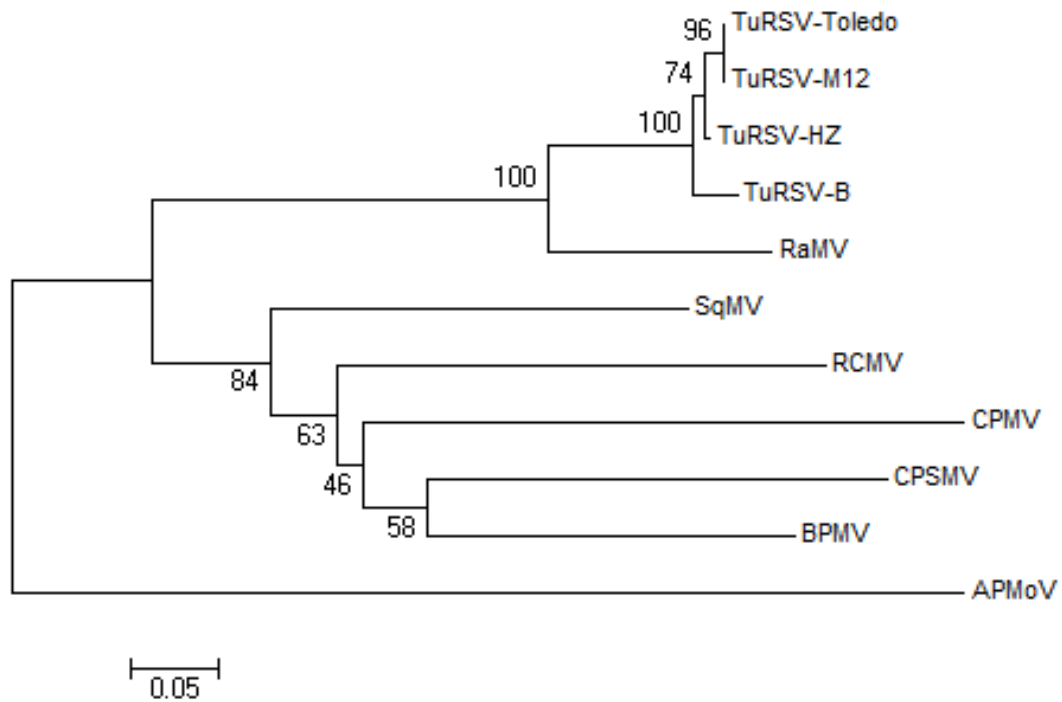


**Figura 9** Árvore filogenética dos comovírus baseada na comparação da sequência completa de aminoácidos da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1).

**Tabela 6** Distâncias evolucionárias dos comovírus baseada na comparação da sequência completa de aminoácidos da RNA polimerase dependente de RNA (RNA 1).

	TuRSV- M12	TuRSV- To	TuRSV- B	RaMV	SqMV	CPMV	RCMV	CPSMV	BPMV	APMoV
TuRSV- M12										
TuRSV- To	0.03									
TuRSV- B	0.03	0.06								
RaMV	0.24	0.24	0.24							
SqMV	0.46	0.47	0.46	0.45						
CPMV	0.44	0.44	0.43	0.44	0.43					
RCMV	0.44	0.44	0.44	0.43	0.45	0.38				
CPSMV	0.45	0.45	0.44	0.44	0.45	0.45	0.48			
BPMV	0.46	0.45	0.45	0.46	0.47	0.42	0.43	0.45		
APMoV	0.50	0.50	0.50	0.50	0.51	0.50	0.50	0.52	0.53	

Da mesma forma, para a sequência completa de aminoácidos da LCP, do RNA 2, também foi feita a árvore filogenética (Figura 10) e os cálculos das distâncias evolucionárias entre os *Comovirus* (Tabela 7).



**Figura 10** Árvore filogenética dos comovírus baseada na comparação da sequência completa de aminoácidos da *Large coat protein* (RNA 2).

Ao analisarmos as árvores filogenéticas e os valores das distâncias evolucionárias referentes às sequências de aminoácidos parciais da RdRp e das sequências parciais da LCP, podemos observar que estes resultados estão de acordo com aqueles observados nas análises feitas utilizando as sequências completas de aminoácidos destas proteínas. Ou seja, as relações filogenéticas dos isolados estudados (incluindo o TuRSV-PR) determinadas neste trabalho, estão próximas daquelas determinadas após analisadas com base nas sequências completas das respectivas regiões codificadoras da RdRp e da LCP.

**Tabela 7** Distâncias evolucionárias dos comovírus baseada na comparação da sequência completa de aminoácidos da *Large coat protein* (RNA 2).

	TuRSV -HZ	TuRSV -To	TuRSV -M12	TuRSV -B	RaMV	SqMV	CPMV	RCMV	CPSM V	BPMV	APMo V
TuRSV- HZ											
TuRSV- To	0.01										
TuRSV- M12	0.01	0.00									
TuRSV-B	0.04	0.04	0.04								
RaMV	0.20	0.20	0.20	0.20							
SqMV	0.46	0.47	0.47	0.46	0.49						
CPMV	0.54	0.54	0.54	0.54	0.56	0.48					
RCMV	0.50	0.51	0.51	0.52	0.54	0.42	0.48				
CPSMV	0.50	0.51	0.51	0.51	0.50	0.43	0.49	0.46			
BPMV	0.48	0.49	0.49	0.51	0.53	0.40	0.42	0.38	0.37		
APMoV	0.61	0.61	0.61	0.61	0.59	0.59	0.63	0.60	0.68	0.65	

Maliogka et al. (2004), após realizar o sequenciamento parcial da RdRp, utilizando *primers* degenerados, comparou a árvore filogenética obtida, a nível de aminoácidos, com a árvore filogenética proveniente do sequenciamento completo dos aminoácidos da RdRp. Após estas comparações, os mesmos autores afirmam que, por apresentarem resultados semelhantes, estas análises seriam filogeneticamente representativas, apesar de não terem sido baseadas no sequenciamento completo da proteína RdRp.

As árvores calculadas para a sequência parcial mostradas anteriormente, foram similares àquelas calculadas para a sequência completa de aminoácidos da RdRp e da LCP.

Estes dados mostram que as amplificações obtidas usando os *primers* descritos neste trabalho, também seriam filogeneticamente informativas para o posicionamento taxonômico do vírus estudado.



Desta forma, conclui-se que o vírus em questão é um *Comovirus*, identificado como sendo o TuRSV, denominado de isolado Paraná (TuRSV-PR).

## CONCLUSÕES

Após as análises de microscopia eletrônica, testes sorológicos, biológicos e moleculares realizados a partir de material obtido de plantas sintomáticas de rúcula, conclui-se que o vírus associado à infecção, trata-se do *Turnip ringspot virus*, um *Comovirus* de crucíferas.

Este é o primeiro relato deste vírus no hemisfério sul. Resultados da gama de hospedeiras e sequenciamento parcial do RNA 1 e RNA 2 deste isolado sugerem que, possivelmente, este seja uma estirpe diferente daquelas já descritas na literatura e já sequenciadas.

Este é mais um isolado, de uma nova região geográfica, disponível para o estudo da variabilidade intra-específica deste vírus.

O sequenciamento completo do genoma deste isolado do TuRSV, poderá fornecer subsídios para comparações mais aprofundadas com outros *Comovirus* de brássicas já sequenciados, para melhor caracterizá-lo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALQASOUMI, S., AL-SOHAIBANI, M., AL-HOWIRINY, T., AL-YAHYA, M., RAFATULLAH, S. Rocket “*Eruca sativa*”: A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. **World Journal of Gastroenterology**, 15(16): 1958-1965. 2009.

ÁVILA, A. C. de. **Caracterização de um isolado do vírus do mosaico do nabo no Brasil**. Brasília, UnB, 1979. 115p. (Dissertação de Mestrado).

ÁVILA, A. C., LIN, M. T., KITAJIMA, E. W., CUPERTINO, F. P. & COSTA, C. L. Caracterização de um isolado do vírus do mosaico do nabo obtido de couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.) sem sintomas. **Fitopatologia Brasileira**, 5: 311-328. Outubro, 1980.

BRUNT, A. A., BARTON, R. J., PHILLIPS, S., JONES, R. A. C. *Ullucus virus* C, a newly recognised comovirus infecting *Ullucus tuberosus* (Basellaceae). **Annals of Applied Biology**, 101: 73-78. 1982.

BRUNT, A. A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M. J., GIBBS, A. J., WATSON, L. & ZURCHER, E. J. (eds.). **Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from VIDE Database**. Wallingford: CAB Internacional. 1996. Disponível em: <http://pvo.bio-mirror.cn/refs.htm/>. Acesso: 20 de outubro de 2009.

CARDOSO, R. M., OLIVEIRA, M A., LEITE, R. M., BARBOSA, C. J., BALBINO, L. C. **Doenças de canola no Paraná**. Boletim técnico nº 51. IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná. Setembro, 1996. Londrina, PR. 28 p.

CEASA/PR. Centrais de Abastecimento do Paraná S.A. **Estatísticas de produtos comercializados**. 2008. Disponível em <<http://www.ceasa.pr.gov.br>>. Acesso: 17 de outubro de 2010.

CHAVI, F., ROBERTSON, A.I. & VERDUION, B.J.M. Survey and characterization of viruses in sweet potato from Zimbabwe. **Plant Disease** 81: 1115-1122. 1997.

CHEN, J., CHEN, J., ADAMS, M.J. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of Virology** 146: 757-766. 2001.

COLINET, D., NGUYEN, M., KUMMERT, J., LEPOIVRE, P. & XIA, F.Z. Differentiation among potyviruses infecting sweet potato based on genus-and

virus-specific transcription polymerase chain reaction. **Plant Disease** 82: 223-229. 1998.

FAHL, J. I., CAMARGO, M. B. P. de, PIZZINATTO, M. A., BETTI, J. A., MELO, A. M. T. de, DEMARIA, I. C., FURLANI, A. M. C, (Eds.). **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 6ª Ed. Campinas, SP: IAC, 1998. 396 p. (IAC. Boletim 200).

FARZADFAR, S., POURRAHIM, R., GOLNARAGHI, A. R., JALALI, S., AHOONMANESH, A. Occurrence of *Radish mosaic virus* on cauliflower and turnip crops in Iran. **Plant Disease** 88: 909. 2004

GRACIA, O., IGLESIAS, V.A., FELDMAN, J.M. Viroses de las crucíferas en la región de Cuyo, Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, 15(4): 327-333. 1990.

GOLDBACH, R. Molecular evolution of plant RNA viruses. **Annual Review of Phytopathology** 24: 289-310. 1986.

GOLDBACH, R. & WELLINK, J. Comoviruses: molecular biology and replication. **The Plant Viruses** 5. 1996.

HARRIS, K., JEFFERY, H. Sulforaphane and erucin increase MRP1 and MRP2 in human carcinoma cell lines. **The Journal of Nutritional Biochemistry** 19: 246-254. 2008.

HORA, R. C., GOTO, R., BRANDÃO FILHO, J. O lugar especial da produção de hortaliças no agronegócio. **Agrianual 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, p. 322-323, 2004.

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

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

KHOOBCHANDANI, M., OJESWI, B., GANESH, N., SRIVASTAVA, M., GABBANINI, S., MATERA, R., IORI, R., VALGIMIGLI, L. Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plants extracts. **Food Chemistry** 120: 217-224. 2010.

KOBAYASHI, Y. O., KOBAYASHI, A., NAKANO, M., HAGIWARA, K., HONDA, Y., OMURA, T. Analysis of genetic relationships between *Broad bean*

*wilt virus 1* and *Broad bean wilt virus 2*. **Journal of General Plant Pathology** 69: 320-326. 2003.

KOBAYASHI, Y. O., KOBAYASHI, A., HAGIWARA, K., UGA, A., MIKOSHIBA, Y., NAITO, T., HONDA, Y., OMURA, T. *Gentian mosaic virus*: a new species in the Genus *Fabavirus*. **Phytopathology** 95: 192-197. 2005.

KOENING, R., FISCHER, H. U. A Moroccan *Radish mosaic virus* isolate from turnip. **Plant Disease** 68:758-760. 1981.

KOLONIUK, I. & PETRZIK, K. Complete genome sequence of *Turnip ringspot virus*. **Archives of Virology** 154: 1851-1853. 2009.

KOLONIUK, I., SPAK, J., PETRZIK, K. *Turnip ringspot virus* recognized on Chinese cabbage in Russia. **European Journal of Plant Pathology** 122: 447-450. 2008.

KOMATSU, K., HASHIMOTO, M., MAEJIMA, K., OZEKI, J., KAGIWADA, S., TAKAHASHI, S., YAMAJI, Y., NAMBA, S. Genome sequence of a Japanese isolate of *Radish mosaic virus*: the first complete nucleotide sequence of a crucifer-infecting comovirus. **Archives of Virology** 152:1501-1506. 2007.

KOMATSU, K., HATADA, K., HASHIMOTO, M., OZEKI, J., MAEJIMA, K., KAGIWADA, S., YAMAJI, Y., NAMBA, S. Complete nucleotide sequence of a California isolate of *Radish mosaic virus*. **Archives of Virology** 153:2167-2168. 2008.

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

KOONIN, E., GORBALENYA, A. E., CHUMAKOV, K. M. Tentative identification of RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA viruses and their relationship to positive strand RNA viral polymerases. **FEBS Letters** 252: 42-46. 1989.

LAMY, E., SCHRÖDER, J., PAULUS, S., BRENK, P., STAHL, T., MERSCH-SUNDERMANN, V. Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erucolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. **Food and Chemical Toxicology** 46: 2415-2421. 2008.

LE GALL, O., CANDRESSE, T., DUNEZ, J. A multiple alignment of the capsid protein sequences of nepoviruses and comoviruses suggests a common structure. **Archives of Virology** 140: 2041-2053. 1995.

LE GALL, O., SANFACON, H., IKEGAMI, M., IWANAMI, T., JONES, T., KARASEV, A., LEHTO, K., WELLINK, J., WETZEL, T., YOSHIKAWA, N.

Cheravirus and Sadwavirus: two unassigned genera of plant positive sense single-stranded RNA viruses formerly considered atypical members of the genus *Nepovirus* (family *Comoviridae*). **Archives of Virology** 159: 1767–1774. 2007.

LE GALL, O., CHRISTIAN, P., FAUQUET, C. M., KING, A., KNOWLES, N. J., NAKASHIMA, N., STANWAY, G., GORBALENYA, A. E. *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. **Archives of Virology** 153: 715-727. 2008.

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** 81: 541-547. 2000.

LIMA, M.L. **Estudo de três viroses de crucíferas transmitidas por afídeos**. Piracicaba, ESALQ/USP, 1979. 118p. (Tese de Doutorado).

LIMA, M. L., COSTA. A. S., KOEHLER, H. S. Perdas na produção de rabanetes e nabos causadas pelo vírus do mosaico do nabo e mosaico da couve-flor. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, 2: 23-28. 1980.

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

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Volume 2, 4ª edição. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 285-291. 2005.

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

MELCHINI, A., COSTA, C., TRAKA, M., MICELI, N., MITHEN, R., DE PASQUALE, R., TROVATO, A. Erucin, a new promising cancer chemopreventive agent from rocket salads, shows anti-proliferative activity on human lung carcinoma A549 cells. **Food and Chemical Toxicology** 47: 1430-1436. 2009.

MELCHINI, A. & TRAKA, M. Biological profile of erucin: a new promising anticancer agent from cruciferous vegetables. **Toxins** 2:593-612. 2010.

MILNE, R., MASENGA, R., LOVISOLO, O. *Radish mosaic virus* in *Eruca sativa* Miller. **Phytopathologia Mediterranea** 19: 145-149. 1980.

- PETRZIK, K., HOLÁ, M. & SPAK, J. Complete nucleotide sequence of *Radish mosaic virus* RNA polymerase gene and phylogenetic relationships in the genus *Comovirus*. **Acta Virologica** 49: 271-275. 2005.
- PETRZIK, K. & KOLONIUK, I. Emerging viruses in the genus *Comovirus*. **Virus Genes** 40: 290-292. 2010.
- PLAKOLLI, M., & STEFANAC, Z. Serological and other relationships among the isolates of *Radish mosaic virus*. **Phytopathologische Zeitschrift** 87: 114-119. 1976.
- RAJAKARUNA, P., KHANDEKAR, S., MEULIA, T., LEISNER, S. Identification and host relations of *Turnip ringspot virus*, a novel *Comovirus* from Ohio. **Plant Disease** vol. 91 n° 10. 1212-1220. 2007.
- ROOSSINCK, M. J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annual Review of Phytopathology** 35: 191-209. 1997.
- SANFAÇON, H., WELLINK, J., LE GALL, O., KARASEV, A., VLUGT, R., WETZEL, T. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. **Archives of Virology** 154:889-907. 2009.
- SPAK, J., KUBELKOVA, D., HNILIOKA, E. Seed transmission of *Turnip yellow mosaic virus* in winter turnip oilseed rapes. **Annals of Applied Biology**, 123(1):33-35. 1993.
- SPAK, J. & KUBELKOVÁ, D. Serological variability among European isolates of *Radish mosaic virus*. **Plant Pathology** 49: 295-301. 2000.
- SPERANDIO, C. A. **Caracterização do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Universidade de Brasília, Brasília-DF. 1982. (Dissertação de Mestrado).
- USDA. **Nutrient Database for Standard Reference**. Release 17 (July 2004). Disponível em <[http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl)>. Acesso: 20 de agosto de 2010.
- WALKEY, D. G. A. **Applied Plant Virology**. Wiley – Interscienc publication, a Division of John Wiley & Sons, Inc. New York, 1985. 329 p.
- WELLINK, J. Comovirus Isolation and RNA Extraction. In: FOSTER, G.D. & TAYLOR, S.C. (Eds.). **Methods in Molecular Biology**, volume 81: Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance. Human Press, Inc. 1998. 571 p.

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

YANIV, Z., SCHAFFERMAN, D., & AMAR, Z. Tradition, uses, and biodiversity of rocket (*Eruca sativa*) in Israel. **Economic Botany** 52: 394-400. 1998.

ZEIN, S. N. & SHAFIE, M. S. *Radish mosaic comovirus* (RaMV) isolated from *Eruca Sativa* L. **Egyptian Journal of Virology** 2: 61-76. 2005.