



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

EMANUEL FELIPE MEDEIROS ABREU

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) E
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) NO BRASIL.**

Brasília
2012

EMANUEL FELIPE MEDEIROS ABREU

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) E
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) NO BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, como requisito parcial obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão

**Brasília
2012**

A162 Abreu , Emanuel Felipe Medeiros.
Variabilidade genética do Cowpea severe mosaic virus (CPSMV) e
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) no Brasil / Emanuel
Felipe Medeiros Abreu . – Brasília, 2012.
202. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão.

Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de
Brasília, 2011.

1. Feijão Caupi 2. Melhoramento Genético. 3. Resistência
Derivada do Patógeno. 4. Viroses I. Universidade de Brasília II.
Aragão, Francisco José Lima, Orient. III. Título.

CDD 631.523 3

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) E
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) NO BRASIL.**

EMANUEL FELIPE MEDEIROS ABREU

TESE DEFENDIDA E APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM
10/02/2012.

Dr. Francisco José Lima Aragão
(Orientador/ Embrapa Cenargen)

Dra. Simone da Graça Ribeiro
(Embrapa Cenargen)

Dra. Fernanda Rausch Fernandes
(Embrapa CNPH)

Dr. Giovanni Rodrigues Vianna
(Embrapa Cenargen)

Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade
(Embrapa CNPMF)

Dedico essa Tese aos meus pais, Joaquim Antônio Abreu e Ana Lúcia Abreu, e ao meu grande amigo e querido irmão, Henrique Abreu. Pelo apoio e amor de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao grande Deus por todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais Joaquim Antônio Abreu de Oliveira e Ana Lúcia Medeiros Abreu, pelo grande amor, dedicação, apoio e luta em busca da melhor educação possível.

Ao meu grande amigo e irmão Henrique Abreu, por estar sempre ao meu lado com toda sua admiração, amor e apoio de todas as horas.

Àos meus familiares: Avós, Tios, Tias, Primos e Primas, pelo apoio, palavras de incentivos e amor.

À minha amada e linda namorada Bruna Mendonça Lima, pelo seu amor, amizade, dedicação e palavras de apoio e incentivo.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Departamento de Biologia Celular pela oportunidade de realização da minha tese de doutorado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, especialmente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela ajuda financeira, apoio durante todo o desenvolvimento da minha tese e pela disponibilização da infraestrutura para o desenvolvimento científico deste trabalho.

Ao Dr. Francisco José Lima Aragão, pela orientação, ensinamentos e instimável amizade, apoio e incentivo durante o curso.

Ao Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade, pelos ensinamentos, parceria e apoio durante vários momentos importantes e difíceis da tese.

Ao Dr. Giovanni Rodrigues Vianna, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

À Dra. Simone da Graça, pelos ensinamentos, colaboração durante a execução da tese e por aceitar meu convite para a defesa.

À Dra. Fernanda Raush, pelo apoio e contribuições durante a qualificação e banca de defesa de tese.

À amiga Elsa Nogueira, por estar sempre disposta a ajudar na lida do laboratório.

Aos grandes amigos de Brasília: Giovanni Vianna, Nicolau Brito, Welcimar Cunha, Júlio Carlyle, Cristiano Lacorte, Cristiane Citadin, Maria Laine, Sérgio, Osmundo Brilhante, Thais Cipriano, Sharon Lisauska, Andrea Cruz, Elsa Nogueira e Fernanda Raush.

Aos grandes amigos de Cruz das Almas: Adriana Accioly, Olga Marques, Luciano Braga, Fátima Costa Pinto, Carlos Ledo e Milene, Mariana Lira, Harllen Sandro, Fernando Haddad, Eduardo Chumbinho, Antônio Nascimento e Rudiney.

À colega Lucidalva Ribeiro Pinheiro pela ajuda na formatação da Tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro junto ao programa de pós graduação em Biologia Molecular da UnB.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma importante leguminosa para o Nordeste brasileiro e tem sido tradicionalmente cultivada por pequenos agricultores. Doenças virais são consideradas um dos principais fatores limitantes da produtividade do caupi nesta região. A doença do mosaico severo do caupi é causada pelo *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), subfamília *Comovirinae*, gênero *Comovirus*, juntamente com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, são consideradas as viroses mais prevalentes da cultura e responsáveis por grandes perdas na produção. O objetivo do presente trabalho foi estudar a variabilidade genética do CPSMV e CABMV obtidos em diferentes municípios do Nordeste brasileiro. Essa informação é crucial para o desenvolvimento de plantas resistentes a essas viroses tanto por métodos convencionais quanto moleculares de melhoramento. Isso é ainda mais crítico para o desenvolvimento de estratégias baseadas em RNA interferente (RNAi). Plantas com sintomas de infecção pelo CPSMV e CABMV nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Distrito Federal, Sergipe e Bahia foram coletadas, e os isolados foram identificados por Dot-blot e RT-PCR. Foram amplificados fragmentos de 2200 pb, (correspondendo a região da Helicase (Hel), Proteína ligada ao genoma viral (VPg), Picornain 3C- protease (Pro) e RNA polimerase) e 997 pb (correspondendo a região da proteína Inclusão Cilíndrica (CI) e da proteína 6K2) dos vírus CPSMV e CABMV por RT-PCR, respectivamente. Alguns fragmentos foram clonados e outros sequenciados diretamente do produto de PCR em ambas as orientações. As sequências obtidas a partir de diferentes isolados foram comparadas com sequências disponíveis no GenBank. Os alinhamentos das sequências foram obtidos usando o programa Clustal W, e uma árvore filogenética foi criada usando o software MEGA 5.1. A análise revelou baixa variabilidade entre isolados de CPSMV, variando entre 98 e 100% para sequências de nucleótidos e 96-100% para a sequência de aminoácidos deduzida. Entre os CABMV isolado, a variabilidade foi maior, variando 84-99% entre as sequências de nucleótidos 91 a 99% das sequências de aminoácidos. Este estudo fornece informações que serão a base para o desenvolvimento de estratégias para a produção de linhagens de caupi resistentes a estes vírus por RNA interferente. Os dados indicam a possibilidade de obtenção de resistência durável e aplicável ao caupi nas principais áreas produtoras no Brasil.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata*) is an important plant crop in Northeast Brazil being traditionally cultivated by small farmers. Virus diseases are considered to be the main factor limiting cowpea yield in the region. The severe mosaic disease caused by the *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), subfamily *Comovirinae*, genus *Comovirus*, seems to be one of the most prevalent diseases leading to high yield losses in this crop. The *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) belongs to the genus *Potyvirus* in the *Potyviridae* family, and infects cowpea worldwide. In the northeastern region of Brazil, both viruses can be found in cowpea planted areas. The aim of the present study was to access the degree of homology among regions amplified of different isolates of CPSMV and CABMV, respectively; obtained in different northeastern regions in Brazil, and to compare it to isolates throughout the world. Plants with CPSMV and CABMV symptoms from the states of Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraiba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia and Distrito Federal were collected, and the isolates were identified by RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from infected tissue and afterwards used for synthesis of cDNA fragments by RT-PCR. The synthesized primers were able to amplify fragments of 2200 and 997 bp of the CPSMV and CABMV virus, respectively. Amplification products were directly cloned into the pGEMT-Easy plasmid vector (Promega), according to the manufacturer's instructions. Cloned fragments were sequenced in both orientations. Deduced amino acid sequences of the virus were compared to sequences available from GenBank. Multiple sequence alignments were obtained with Clustal W. Phylogenetic trees using the MEGA version 5.1 software package and the neighbour-joining method with Poisson correction. Tree branches were bootstrapped with 1000 permutations. CPSMV and CABMV diseases remain as limiting factors in this crop in Brazil, and breeding programs, either by conventional or engineered approaches, should be targeted at establishing resistance of cowpeas to CPSMV and CABMV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Planta de feijão-caupi com sintomas severos decorrentes da infecção pelo CPSMV..... 21
- Figura 2 - Estrutura das duas partículas do vírus CPSMV. Ilustração representando o genoma bipartido em duas partículas isométricas comuns aos vírus do gênero *Comovirus*. Ambas as partículas são constituídas de duas proteínas capsidiais, uma menor (23 KDa) e outra maior (37 KDa). 22
- Figura 3 - Estrutura do genoma do CPSMV. Ilustração representando os dois segmentos do genoma, RNA 1 e RNA 2 (um maior e outro menor, respectivamente) e os respectivos genes presentes em cada segmento. Cada RNA genômico está ligado a uma proteína VPg na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3'..... 22
- Figura 4 - Esquema da estrutura da partícula dos vírus da Família *Potyviridae*. Ilustração representando a organização da partícula alongada e flexuosa comum nas diferentes espécies da família *Potyviridae*. O genoma contém cerca de 2000 cópias da proteína capsidial de aproximadamente 34 KDa..... 26
- Figura 5 - Estrutura do genoma do CABMV. Ilustração representando o genoma contendo a ORF que produz uma poliproteína ligada covalentemente a VPg na extremidade 5' e uma poliadenilação na extremidade 3'; e os genes presentes nos genomas com os respectivos sítios de clivagem..... 27
- Figura 6 - Planta de feijão-caupi com sintomas severo de infecção pelo CABMV..... 29
- Figura 7 Mapa indicando as áreas onde foram coletadas as amostras de feijão-caupi. Os círculos preenchidos de cor preto representam as amostras coletadas e sequenciadas, e os círculos não-preenchidos representam as amostras coletadas e não sequenciadas.... 58
- Figura 8 - Sequência de aminoácidos obtida a partir de análises *in silico* de um fragmento da poliproteína codificada pelo genoma RNA1 de CPSMV isolado da Taíba-CE. Helicase (Hel), Proteína ligada ao genoma viral (VPg), Picornain 3C- protease (Pro), RNA polimerase dependente de RNA (RpRd). 61
- Figura 9 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos isolados de Cowpea severe mosaic virus e espécies do gênero *Comovirus* baseado em um fragmento do genoma de 2.200 nt do RNA1. (A). As sequências correspondentes às espécies de *Comovirus* foram retiradas de acessos depositados no GenBank: X00206 (Cowpea mosaic virus), AY744932 (Bean pod mottle virus), GU968732 (Turnip ringspot virus) X64886 (Red clover mottle virus), EU450837 (Radish mosaic virus), GU810903 (Broad

bean true mosaic virus), M83830 (Cowpea severe mosaic virus) and EU421059 (Squash mosaic virus). Os valores de Bootstrap foram gerados a partir de 1.000 repetições e estão expressas nos nós. Em (B) a Árvore filogenética de 11 isolados brasileiros de CPSMV correspondendo a um consenso proveniente de uma sequência de aminoácido deduzida de um fragmento genômico do RNA1 codificando uma poliproteína. 64

Figura 10 - Escala de sintomas de plantas infectadas pelo CPSMV coletadas. A. Sintoma fraco (+): planta apresentando cloroses leves no limbo foliar. B. Sintoma moderado (++): planta apresentando cloroses leves no limbo foliar e o surgimento dos primeiros enrugamentos. C. Sintoma severo (+++): planta apresentando clorose acentuada no limbo foliar, enrugamentos bastante evidentes e algumas bolhosidades. Sintoma muito severo (++++): planta apresentando clorose acentuada no limbo foliar, enrugamentos bastante evidentes e bolhosidades acentuadas. 66

Figura 11 - Diagrama de organização do genoma de RNA1 do CPSMV e correlação das sequências com os isolados coletados. Divergência de distribuição de isolados do feijão-caupi coletados e sequenciados comparado às sequências consensos parciais da poliproteína do RNA1 de *Cowpea severe mosaic virus*, correspondendo a helicase (Hel), proteína viral ligada ao genoma (VPg), picornain 3C- protease (Pro) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (aminoácidos 624 à 1355). As linhas verticais indicam as substituições de aminoácidos e severidade dos sintomas encontrados durante a coleta. Cada isolado apresenta seu escore de severidade dos sintomas de + (leve) a ++++ (severo). Os isolados foram por: TAI: Taíba-CE; TAQ: 2: Taquaritinga do Norte-PE; TER: Teresina-PI; QUE: Queimadas-PB; ITA: Itabaianinha-SE; LAR: Laranjeira do Abdias-RN; BRA: Brazlândia-DF; TAG: Jaguaribe-CE; RUS: Russas-CE; JUP: Jupi-PE; IRE: Irecê-BA. 67

Figura 12 - Sequência deduzida de aminoácidos obtida a partir da análise in silico do fragmento de 997 pb clonado do genoma do CABMV isolado da Taíba-CE. Sequência parcial da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) e da proteína 6K2. 76

Figura 13 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos isolados de Cowpea aphid borne mosaic virus e espécies do gênero *Potyvirus* baseado em um fragmento do genoma de 997 nt do RNA viral. (A). As sequências correspondentes às espécies de *Potyvirus* foram retiradas de acessos depositados no GenBank: HQ880243 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* MG Avr), HQ880242 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* Br1), AF348210 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* Zimbabwe) AY864851 (*Impatiens flower break virus*), NC_016441 (*Yam mosaic virus*) PSU05771 (*Peanut stripe virus*), EU761198 (*Bean common mosaic virus*), AJ312437 (*Bean common mosaic virus*- Isolate cowpea), AY575773 (*Blackeye cowpea mosaic virus*), HQ229994 (*Bean common mosaic necrosis virus*), HQ122652 (*Passion fruit woodiness vírus*), AB246773 (*East asian passiflora vírus*), DQ851493 (*Telosma mosaic virus*), HQ161080 (*Hardenbergia mosaic vírus*), AY656816 (*Wistéria vein mosaic vírus*), JF273466 (*Watermelon mosaic virus*), FJ640973 (*Soybean mosaic vírus*), EF105298 (*Calla lily latente vírus*), AM039800 (*Fritillary vírus* Y). Os valores de Bootstrap foram

gerados a partir de 1.000 repetições e estão expressas nos nós. Em (B) a Árvore filogenética corresponde a um consenso proveniente de uma sequência parcial de aminoácido deduzida de um fragmento genômico que codifica a proteína CI e um fragmento pequeno da proteína 6K2 de seis isolados brasileiros de CABMV..... 81

Figura 14 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos da proteína Inclusão Cilíndrica (CI) e parte da proteína 6K2 codificada pelo genoma dos isolados de CABMV provenientes de caupi e maracujá coletados em diferentes regiões produtoras no Nordeste Brasileiro. O sítio de clivagem CI/6K2 está indicado em verde. Os motivos conservados presentes na região codificadora da proteína CI estão indicados em vermelho. As mutações presentes na região de clivagem CI/6K2 e nas demais regiões estão marcadas em azul. Os asteriscos indicam posições conservadas de aminoácido entre os isolados. 83

Figura 15 - Estrutura tridimensional do segmento genômico de 150 pb da região da Protease (Pro) do CPSMV. 89

Figura 16 - Estrutura tridimensional do segmento genômico de 150 pb da região da Protease (Pro) do CPSMV. 90

Figura 17 - Estrutura tridimensional do cassete de interferência contendo os segmentos genômicos de 150 pb do CPSMV e CABMV no sentido senso e antisenso e intro PDK. 92

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Primers usados para amplificação CPSMV em feijão-caupi.....	59
Tabela 2 Regiões de coleta do feijão-caupi que foram sequenciados e sua associação com o nível de sintoma encontrado.....	60
Tabela 3 - Porcentagem de identidade entre os nucleotídeos (diagonal acima) e aminoácidos deduzidos (diagonal abaixo) a partir da análise de sequências de um fragmento de RNA1 (2.200 nt) proveniente de 11 isolados brasileiros de CPSMV.	63
Tabela 4 - Primers usados para amplificação dos isolados de CABMV de feijão-caupi.....	74
Tabela 5 - Regiões de coleta do feijão-caupi que foram sequenciados e sua associação com o nível de sintoma encontrado. (Colocar os sintomas).....	76
Tabela 6 - Porcentagem de identidade entre os nucleotídeos (diagonal acima) e aminoácidos deduzidos (diagonal abaixo) a partir da análise das sequências do fragmento genômico (997 nt) provenientes de 6 isolados brasileiros de CABMV.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Nt	Nucleotídeo
AA	Aminoácido
KDa	Quilodalton
°C	Grau Celsius
mL	Militro
mM	Milimolar
Mg	Miligrama
Min	Minuto
Pb	Pares de base
µg	Micrograma
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa
UTR	Região não traduzida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO I.....	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.0 FEIJÃO-CAUPI (<i>VIGNA UNGUICULATA</i> (L.) WALP.)	17
1.1 Principais vírus que infectam o feijão-caupi no Brasil.....	18
1.1.2 <i>Cowpea severe mosaic virus</i>	19
1.1.3 Família <i>Potyviridae</i>	24
1.1.4 <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	28
1.2 Importância do estudo da variabilidade genética dos vírus de planta.	30
1.3 Mecanismos de resistência derivada do patógeno.....	33
2. OBJETIVOS	38
2.1.1 Objetivo Geral.....	38
2.1.2 Objetivos Específicos.....	38
4.0 REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II	55
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO CPSMV	55
1.0 INTRODUÇÃO	56
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	57
2.2 RNA Dot-blot.....	57
2.3 Extração de RNA e sequenciamento do fragmento de RNA 1	58
2.4 Análises das seqüências.....	59
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.0 REFERÊNCIAS	69
CAPÍTULO III.....	71

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO CABMV	71
1.0 INTRODUÇÃO	72
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 Coleta do Material Vegetal	73
2.2 RNA Dot-blot	73
2.3 Extração de RNA e sequenciamento do fragmento de RNA.....	74
Fonte: Autor da tese, 2011.....	74
2.4 Análises das seqüências.....	75
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.0 REFERÊNCIAS	84
CAPÍTULO IV	86
DETERMINAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DO CPSMV E CABMV PARA USO NA OBTENÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES VIA ESTRATÉGIAS DE RNAI.....	86
1 INTRODUÇÃO	87
2.0 MATERIAL E MÉTODOS	87
2.1 Análise termodinâmica das sequências obtidas.....	87
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1 Análise termodinâmica dos segmentos genômicos do CPSMV e CABMV	88
4 REFERÊNCIAS	93
CAPÍTULO V	94
APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	94
Anexo.....	97

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é uma leguminosa de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, o feijão-caupi é especialmente cultivado na região Nordeste, por pequenos produtores que normalmente consomem toda sua produção. Mais recentemente, a produção tem-se expandido para a região Centro-Oeste. A área média de cultivo do feijão-caupi no Brasil é de 1,3 milhões de hectares e a sua produtividade média de 366 kg/ha é considerada baixa (CONAB, 2012). Os primeiros trabalhos visando o melhoramento do caupi no Nordeste foram iniciados na década de 60 e tinham como objetivo básico o aumento da produtividade (KRUTMAN et al., 1968; PAIVA et al., 1970). A partir da década de 80, foram iniciados os primeiros trabalhos com a finalidade de se fazer melhoramento do caupi para várias características, e este tem sido feito visando o aumento da produtividade e resistência a vírus (LIMA 2005b). A obtenção de plantas resistentes a vírus tem se tornado cada vez mais relevante, pois ainda é um dos mais importantes fatores limitantes da produção na cultura (LIMA et al., 2005; GHORBANI et al., 2008).

Em vários lugares do mundo já foram encontrados mais de 20 espécies diferentes de vírus infectando o caupi. No Brasil, dentre as viroses que infectam o caupi, destacam-se, principalmente, as causadas pelos vírus *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV, do gênero *Comovirus*, o *Cowpea aphid borne mosaic virus* - CABMV, do gênero *Potyvirus*, o *Cucumber mosaic virus* - CMV, do gênero *Cucumovirus* e o *Cowpea golden mosaic virus* - CpGMV, do gênero *Begomovirus* (LIMA et al, 2005a). Dentre todas essas viroses, o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e o *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) ocupam posição de destaque em relação às demais, pois são importantes fatores limitantes da produtividade de várias cultivares de *Vigna* em diferentes partes do mundo onde o caupi é cultivado, as quais influenciam na qualidade e na quantidade de grãos produzidos (PIO-RIBEIRO et al., 2005; FERNANDES, 2006).

Uma alternativa interessante para o controle do CPSMV e CABMV é o uso de cultivares resistentes. A utilização de plantas transgênicas engenheiradas com a finalidade de explorar o conceito da interferência de RNA (RNAi) para o silenciamento de genes virais é uma estratégia bastante atraente e eficiente na geração de plantas resistentes (BUCHER et al., 2006; Bonfim et al., 2007; ARAGÃO; FARIAS, 2009). Neste contexto, o presente estudo visa fornecer informações da variabilidade genética de diferentes isolados provenientes das principais municípios produtores de caupi no

Brasil, que serão a base para o desenvolvimento de estratégias para a geração de linhagens de caupi resistentes ao CPSMV e CABMV.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.0 FEIJÃO-CAUPI (*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.)

O feijão-caupi, também conhecido como caupi, feijão-de-corda, feijão-vigna ou feijão-macassar, desempenha um importante papel socioeconômico no Nordeste brasileiro e em muitos países da África e Ásia. Estudos têm revelado que o feijão-caupi originou-se no continente africano e expandiu-se pela Arábia, Ásia e Mediterrâneo. Acredita-se que este foi introduzido na América Latina no século XVI, pelos colonizadores espanhóis e portugueses; primeiramente nas colônias espanholas sendo em seguida introduzido no Brasil pelos colonizadores portugueses, provavelmente, pelo estado da Bahia e a partir daí expandiu-se por todo o país (FREIRE FILHO et al., 2005; SILVA, 2008).

O feijão-caupi é geralmente cultivado no Brasil especialmente na região nordeste, por pequenos produtores que normalmente consomem toda sua produção. Este é uma excelente fonte de proteínas (23-25% em média) e apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas e baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média) (PHILIPS et al., 2003). Pelo seu valor nutritivo, o caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos secos ou verdes, visando o consumo humano. Além disso, o feijão-caupi é também utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e ainda, como adubação verde e proteção do solo. Devido ao seu baixo custo de produção, a FAO aponta que a cultura é uma das melhores alternativas para o aumento da oferta de alimento básico para as populações de baixa renda de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (PHILIPS et al., 2003).

O Brasil apresenta-se como o maior produtor e consumidor mundial de caupi, sendo o Ceará o maior produtor nacional, com estimativa em cerca de 20% da produção brasileira (CONAB, 2012). A área média de cultivo no Brasil do feijão-caupi é de 1,3 milhões de hectares onde são produzidas cerca de 480 mil toneladas. A produtividade média é baixa (366 kg/ha), em função do baixo nível tecnológico empregado no cultivo que é feito predominantemente por pequenos agricultores numa exploração de subsistência, sem a adoção de práticas adequadas, como o controle de pragas e doenças.

Os primeiros trabalhos visando o melhoramento do caupi no Nordeste foram iniciados na década de 60 e tinham como objetivo básico o aumento da produtividade

(KRUTMAN et al., 1968; PAIVA et al., 1970). Comparada a outras culturas, o caupi tem o seu potencial genético muito pouco explorado, entretanto, possui uma ampla variabilidade genética para praticamente todos os caracteres de interesse agrônômico (FREIRE FILHO et al., 1981, 1992; BEZERRA et al., 1997; BARROS et al., 2011).

Nas três últimas décadas, embora se reconheça a necessidade de se fazer melhoramento do caupi para várias características, este tem sido feito, principalmente, visando o aumento da produtividade e a resistência a vírus (ARAÚJO; CARDOSO, 1981; FREIRE FILHO et al., 1986, 1991; MIRANDA et al., 1995, 1996; COELHO et al., 1998; LIMA 2005b; SILVA, 2008). A obtenção de plantas resistentes a vírus tem se tornado cada vez mais relevante, pois este é um dos mais importantes fatores limitantes da produção na cultura, dadas às dificuldades de controle e a forma de disseminação (LIMA et al., 2005; ORAWU et al., 2005; GHORBANI et al., 2008).

Em se tratando das principais viroses que infectam o feijão-caupi no Brasil, os danos causados pelo CPSMV e CABMV podem ser significativos, dependendo da cultivar plantada e da época do ano que apareçam os primeiros focos da doença, as perdas podem chegar a até 80% da lavoura plantada (GONÇALVES; LIMA 1982; BOOKER et al., 2005).

1.1 Principais vírus que infectam o feijão-caupi no Brasil

1.1.1 Subfamília *Comovirinae*

A subfamília *Comovirinae*, pertencente à família *Secoviridae* possui três gêneros, sendo eles, os *Comovirus*, *Fabavirus* e *Nepovirus*. O gênero *Comovirus* destaca-se dos demais gêneros por possuir um grupo de vírus amplamente estudado, e algumas espécies deste gênero são responsáveis por grandes perdas em cultura de importância econômica e social no Brasil, como o feijão comum e feijão-caupi. O genoma dos *Comovirus* é bipartido, composto de dois RNAs de fita simples senso positivo, denominados RNA1 ou RNA-B (“bottom component”), com tamanho de cerca 5.900 nt que expressa uma poliproteína originada a partir de duas ORFs sobrepostas compartilhando um mesmo códon, e o RNA2 ou RNA-M (“middle component”) com tamanho de cerca de 3600 nt. Ambos os RNAs são encapsidados separadamente em partículas icosaédricas de diâmetro aproximado de 28nm (revisado por GOLDBACH;

WELLINK, 1996). A poliproteína codificada pelo RNA1, após ser processada, produz 5 proteínas diferentes, uma Protease co-fator (32K) com massa molecular de 32KDa, uma polimerase viral (RpRd) de 87 KDa, uma helicase (Hel) de 58 KDa, uma protease (Pro) de 24 KDa e uma proteína pequena ligada ao genoma (VPg) de 4 KDa. Já a poliproteína codificada pelo RNA2 produz uma proteína de movimento (MP) de 58 KDa, uma segunda proteína de movimento que é produto da primeira de 48 KDa, uma grande proteína capsidial (CP - L) de 37 KDa e uma pequena proteína capsidial (CP - S) de 23KDa (CHEN, BRUENING, 1992). Os RNAs genômicos são covalentemente ligados na sua extremidade 5' UTR a uma proteína viral conhecida por VPg e ambos os RNAs genômicos são poliadenilados nas suas extremidades 3' UTR (HULL, 2002). Tanto o RNA 1 quanto o RNA 2 são encapsidados por 60 cópias de cada uma das duas proteínas capsidiais (CPs), formando uma estrutura conhecida como pseudo T, que é o resultado da associação de 3 partículas virais, designadas por topo (T, concha vazia), meio (M, contendo o RNA2) e fundo (B, contendo o RNA1).

Para a infecção sistêmica das plantas hospedeiras ambos RNAs são necessários. Os vírus do gênero *Comovirus* infectam uma gama relativamente estreita de hospedeiros, limitada, principalmente, para a família das leguminosas (LE et al., 2005; BRADSHAW et al., 2011). A transmissão dos vírus do gênero *Comovirus* ocorre através da inoculação mecânica ou por vetores da ordem dos coleópteros, de forma não persistente e semi-persistente (BARRADAS et al., 1991). No caso do *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), uma espécie do gênero *Comovirus*, os vetores associados a sua transmissão são os coleópteros da família *Chrysomelidae*, destacando-se as espécies *Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa* (COSTA et al., 1978; LIMA et al., 2005a). O primeiro relato sobre *C. arcuata* como vetor do CPSMV data de 1963, no Suriname (VAN HOFF, 1963). A seguir, Debrot e Rojas (1967) observaram o mesmo fato na Venezuela e, no Brasil, a primeira constatação é de Costa et al. (1978). Esta espécie é vetora dos diversos isolados do CPSMV relatados no Brasil.

1.1.2 *Cowpea severe mosaic virus*

O mosaico severo do caupi, causado pelo *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*, é um vírus que infecta plantas em países do Caribe, América e África (FULTON; ALLEN, 1982; LIMA et al., 2005a). O primeiro relato do CPSMV no Brasil foi realizado por Oliveira (1947) no Rio Grande do

Sul, e desde então sua distribuição alcançou todas as regiões produtoras de feijão-caupi (LIMA et al., 2005a), ocasionando danos quantitativos e qualitativos à cultura. Atualmente, esse vírus é considerado uma das principais doenças do caupi, sendo relatado praticamente em todos os estados produtores do Norte e Nordeste do Brasil.

Segundo Kimati et al. (1997) o CPSMV é capaz de infectar naturalmente plantas de feijão-caupi através da transmissão por coleópteros, especialmente, espécies da família *Chrysomelidae*, mas já foi detectado a sua presença em 23 espécies de plantas da família *Leguminosae* (BRIOSO et al., 1994; BERTACINI et al., 1998; PAZ et al., 1999). Os sintomas apresentados por plantas doentes são, no geral, severos, expressos na forma de intenso encrespamento do limbo foliar, em função de numerosas bolhosidades associadas à presença de mosqueado, isto é, alternância nos folíolos de zonas de coloração verde-clara, com outras de cor verde-escura (Figura 1). Frequentemente, são observado subdesenvolvimento das nervuras principais, resultando em enrugamento e redução do limbo, bolhosidades, distorção foliar e, quando as plantas são infectadas no início do ciclo, apresentam intenso nanismo, com severos prejuízos à produção (HULL, 2002; PIO-RIBEIRO et al., 2005).

Estudos conduzidos em casa de vegetação revelaram que, dependendo da idade da planta infectada com o vírus a produção pode ser reduzida em até 80% (FREIRE FILHO et al., 2005). As sementes produzidas nas plantas atacadas apresentam-se deformadas, "chochas" e manchadas, com acentuada redução no poder germinativo.



Figura 1 - Planta de feijão-caupi com sintomas severos decorrentes da infecção pelo CPSMV

Fonte: Autor da tese, 2011.

O CPSMV é um vírus de morfologia isométrica, com diâmetro entre 28 e 30 nm. O capsídeo é formado por 60 cópias de uma proteína maior (37 kDa) e 60 cópias de uma proteína menor (23 kDa) (CHEN; BRUENING, 1992). Seu genoma é dividido em dois segmentos de RNA de fita simples (RNA-1 e RNA-2), os quais são separadamente encapsidados e possuem tamanho de aproximadamente 6.0 e 3.5 Kb, respectivamente (Figura 2). O RNA-1 codifica proteínas envolvidas na replicação do RNA viral, enquanto o RNA-2 codifica as proteínas do capsídeo e a proteína necessária para o movimento, célula a célula e a longa distância do vírus (Figura 3) (GOLDBACH et al., 1980). Ambos os RNAs são necessários para que ocorra a infecção sistêmica na planta hospedeira.

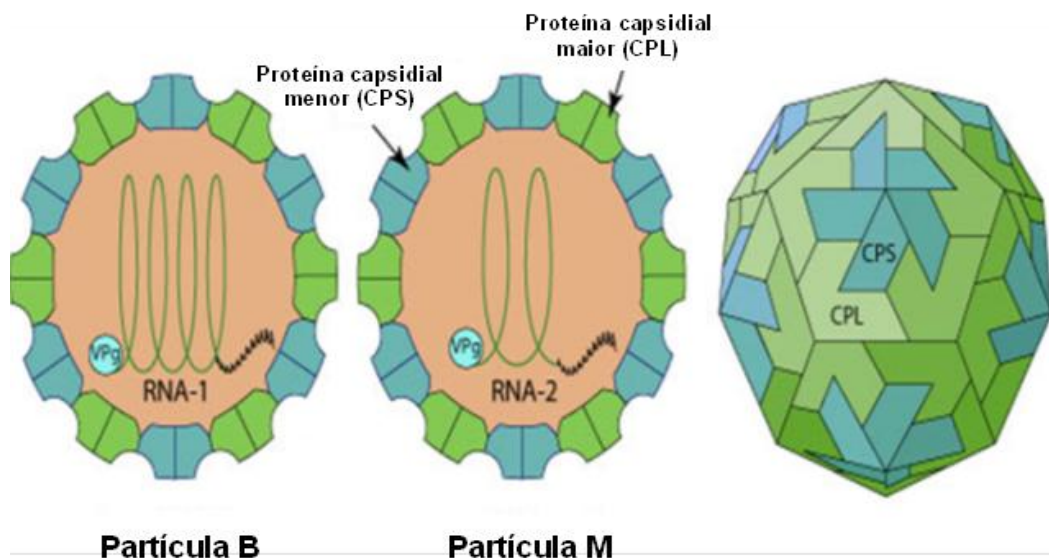


Figura 2 - Estrutura das duas partículas do vírus CPSMV. Ilustração representando o genoma bipartido em duas partículas isométricas comuns aos vírus do gênero *Comovirus*. Ambas as partículas são constituídas de duas proteínas capsiais, uma menor (23 KDa) e outra maior (37 KDa).

Fonte: Adaptado do ViralZone, 2012.

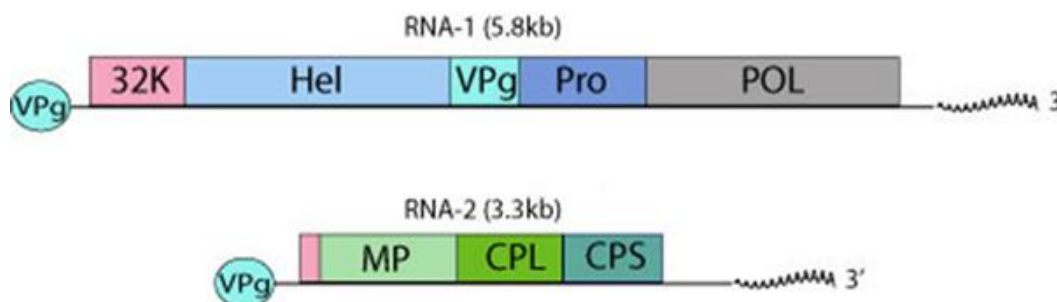


Figura 3 - Estrutura do genoma do CPSMV. Ilustração representando os dois segmentos do genoma, RNA 1 e RNA 2 (um maior e outro menor, respectivamente) e os respectivos genes presentes em cada segmento. Cada RNA genômico está ligado a uma proteína VPg na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3'.

Fonte: Adaptado do ViralZone, 2012.

Quando não controlada, a doença do mosaico severo do caupi, geralmente atinge proporções epidêmicas (BOOKER et al., 2005; KAREEM; TAIWO, 2007). As medidas preventivas de controle do mosaico severo envolvem a aplicação de inseticidas visando

a redução das populações dos insetos vetores (coleópteros da família *Chrysomelidae*) e, conseqüentemente, a diminuição da incidência da doença (FREIRE FILHO et al., 2005; SILVA, 2008). Tal medida tem se apresentado ineficaz no período chuvoso, quando a planta cresce mais intensamente. O alto custo também tem desencorajado a adoção do controle químico dos vetores pelos agricultores.

Em decorrência dessas e de outras razões, a resistência genética tem sido apontada como a medida mais apropriada para o controle do CPSMV (PAZ et al., 1999; Silva, 2008). Fontes de resistência ao CPSMV no germoplasma de caupi têm sido relatadas por diversos pesquisadores que vai desde linhagens com resistência moderada a imune aos diferentes isolados de CPSMV (THOMPSON, 1977; KLAS, 1979; FULTON; ALLEN, 1982; LIMA et al., 1986b; SANTOS et al., 1987; VALE; LIMA, 1995; UMAHARAN et al.1996, PAZ et al., 1999; SILVA, 2008). Fulton e Allen (1982), trabalhando com três isolados da Venezuela, Arkansas (USA) e Costa Rica, mostraram diferenças na virulência entre eles, mas nenhuma interação diferencial entre os genótipos e isolados. Com base nessas evidências sugeriram que a resistência aos isolados mais leves poderia ser estapolada aos isolados mais agressivos. Alguns anos depois, Umaharan (1990) baseado em resultados de screening feito em 160 acessos de um banco de germoplasma em Trinidad e Tobago sugeriu que o isolado encontrado naquele país podia ser um dos mais agressivos isolados encontrados na região do Caribe.

Com a descoberta de genes de resistência ao CPSMV e posterior incorporação dessa resistência em variedades cultivadas, o mosaico severo do caupi perdeu um pouco sua importância, mas continua sendo um dos fatores limitantes da produção em se tratando de cultivares susceptíveis. Thompson (1977) trabalhando com o isolado de CPSMV de Trinidad e Tobago, indicou que a resistência é governada por um único gene de caráter recessivo. Contudo, os resultados mostram um excesso de susceptibilidade. Watt et al. (1985) sugeriram que a resistência a um isolado brasileiro de CPSMV podia ser governado por um ou dois genes. Os estudos mais recentes, relacionados à base genética da resistência ao CPSMV têm apontado, na maioria das vezes, para uma herança monogênica (ASSUNÇÃO et al., 2005; SILVA, 2008). É o caso de algumas cultivares desenvolvidas anteriormente, como: CNC 0434 realizada por Jiménez et al., (1989), Macaibo realizada por Vale e Lima (1995) e da linhagem L 254.008 realiaada por Coelho et al. (1998).

Neste contexto, trabalhos relacionados à estrutura genética de isolados de CPSMV são de fundamental importância para o desenvolvimento de variedades resistentes (GONÇALVES; LIMA, 1982; BOOKER et al., 2005; KAREEM; TAIWO, 2007). Até o momento, apenas um genoma completo do RNA 1 do CPSMV foi sequenciado em todo o mundo, sendo este proveniente de um isolado dos EUA (CHEN; BRUENING, 1992). Apesar do baixo nível de informação, alguns trabalhos de filogenia e variabilidade genética a partir de sequências completas ou parciais do gene da capa proteica (CP) desse vírus foram relatados (LIN et al., 1982; SOUTO et al., 2002; LIMA et al., 2005a, b; CAMARÇO et al., 2009; BESERRA et al., 2011). Contudo, nenhuma informação, até o presente momento, de filogenia e variabilidade genética de outras regiões genômicas desse vírus foram investigadas.

Segundo orientações mais recentes do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), as regiões mais indicadas para estudos taxonômicos e de variabilidade genética entre os *Comovirus* deve ser a região do gene da Protease (Pro) e Polimerase (RpRd) (ICTV, 2011). Por esta razão é cada vez mais iminente a realização de trabalhos para geração e disponibilização de informações nos bancos públicos de sequências genômicas de diferentes regiões, especialmente as regiões de Pro e RpRd, dos diversos isolados de CPSMV, bem como a obtenção de mais sequências completas do genoma de outros isolados de CPSMV.

1.1.3 Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* é uma das maiores e economicamente mais importantes famílias de vírus que infectam plantas, contendo cerca de 16% das espécies descritas (FAUQUET et al., 2005). Os vírus classificados nessa família causam doenças em diversas culturas de clima temperado e tropical, anuais e perenes, fruteiras, hortaliças e grandes culturas, mono e dicotiledôneas. Atualmente, de acordo com o último relatório taxonômico do ICVT de 2011, a família *Potyviridae* está dividida em nove gêneros, sendo oito gêneros bem definidos (*Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*), e um gênero ainda não definido agrupando duas espécies o *Spartina mottle virus* e o *Tomato mild mottle vírus*. Esta família é constituída por aproximadamente 220 espécies, cuja classificação é baseada de acordo com o agente vetor e a organização do genoma (BERGER et al., 2005). A família *Potyviridae* é encontrada em todo o mundo, infectando mais de 2.000 espécies

de plantas. Todos os potyvírus formam corpos de inclusão cilíndricos no citoplasma de células infectadas, também denominados estrutura em “cata-vento”, sendo esta uma característica relevante para a identificação de espécies pertencentes a esta família. Membros dessa família são facilmente transmitidos experimentalmente de plantas infectadas para plantas saudáveis, pela inoculação via extrato vegetal infectado ou utilização de preparações virais purificadas ou concentradas (BERGER et al., 2005). As plantas infectadas por membros da família *Potyviridae* apresentam sintomas que incluem desde mosqueado, mosaico, clorose, necrose, deformações de frutos e folhas (SHUKLA et al., 1994).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família *Potyviridae*, com mais de 100 espécies descritas. Os vírus classificados nesse gênero infectam uma ampla variedade de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Sua transmissão ocorre de maneira não circulativa por afídeos, intermediada por uma proteína auxiliar (Hc-Pro) codificada pelo vírus (FAUQUET et al., 2005; DIPIERO et al., 2006). As partículas virais são alongadas, flexuosas, com 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro (Figura 4). O seu genoma viral é constituído por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nt. O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por cerca de 2.000 cópias da proteína capsidial (CP), que possui massa molecular de aproximadamente 34 KDa (Figura 4).

A proteína capsidial dos *Potyvirus* apresenta uma região amino-terminal altamente variável em tamanho e sequência, uma região central altamente conservada contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal com 18 a 20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, conseqüentemente, da partícula viral (SHUKLA et al., 1991). Segundo Riechmann et al. (1989) o RNA dos potyvírus é covalentemente ligado a uma proteína de origem viral (*genome-linked viral protein*), VPg em sua extremidade 5' (e apresenta uma cauda poliadenilada, de origem viral, em sua extremidade 3' (ALLISON et al., 1986; URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). A VPg e a proteína capsidial (CP) são os únicos produtos gênicos que fazem parte da partícula viral (HOLLINGS; BRUNT, 1981a). O seu genoma possui uma única fase aberta de leitura (ORF) localizada entre as extremidades 5' e 3' não traduzidas (5'UTR e 3'UTR) cuja tradução gera uma poliproteína de 340 a 370 kDa (ALLISON et al., 1986).

A poliproteína é processada por três proteases virais, NIa, P1 e Hc-Pro, contidas na própria sequência, dando origem de 8 a 10 produtos finais de proteína: a proteína N-terminal (P1), o componente auxiliar-protease (Hc-Pro), a proteína P3, a proteína da inclusão citoplasmática (CI), duas proteínas de inclusão nuclear (NIa [VPg-Pro] e NIb), duas proteínas pequenas (6 K1 e 6 K2) e a proteína capsidial (CP) (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001; ADAMS et al., 2005) (Figura 5). As proteases P1 e HC-Pro catalisam unicamente suas próprias clivagens em *cis*. A protease NIa, além de catalisar sua própria clivagem em *cis*, também catalisa seis clivagens adicionais em *trans* (DAROS; CARRINGTON, 1997) (Figura 5). Uma característica das proteínas sintetizadas pelos *Potyvirus* é o seu caráter multifuncional. Cada proteína é geralmente responsável por várias funções durante o ciclo de infecção (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001).



Figura 4 - Esquema da estrutura da partícula dos vírus da Família Potyviridae. Ilustração representando a organização da partícula alongada e flexuosa comum nas diferentes espécies da família *Potyviridae*. O genoma contém cerca de 2000 cópias da proteína capsidial de aproximadamente 34 KDa.

Fonte: Adaptado do ViralZone, 2012.

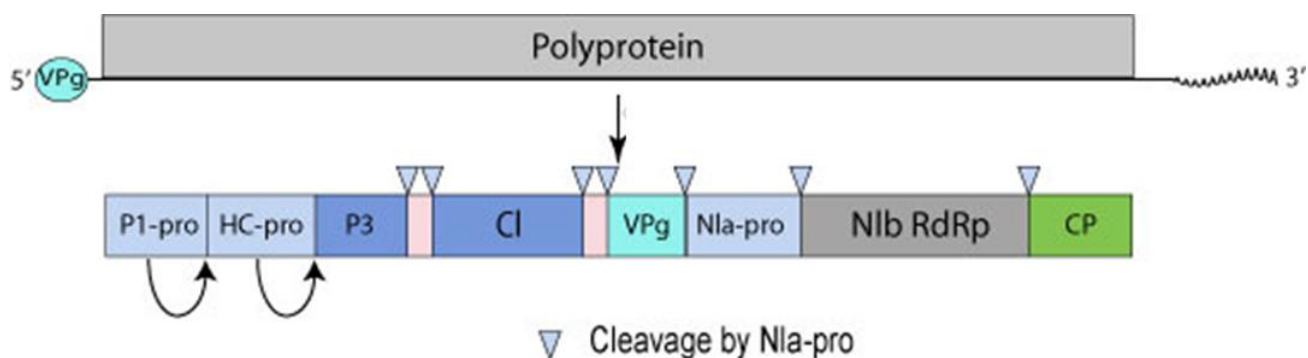


Figura 5 - Estrutura do genoma do CABMV. Ilustração representando o genoma contendo a ORF que produz uma poliproteína ligada covalentemente a VPg na extremidade 5' e uma poliadenilação na extremidade 3'; e os genes presentes nos genomas com os respectivos sítios de clivagem.

Fonte: Adaptado do ViralZone, 2012.

A sequência de nucleotídeos da região 5' UTR dos *Potyvirus* é essencial para a tradução do RNA viral por conter um sítio de entrada interna de ribossomos (BASSO et al., 1994), enquanto a região 3' UTR coopera com a região 5' UTR para uma tradução eficiente (GALLIE et al., 1995). As análises das sequências genômicas de espécies de *Potyvirus* indicam que o nível de identidade entre espécies do gênero é relativamente baixo. O nível de identidade para demarcação de espécies foi proposto em 76% para sequências de nucleotídeos e 82% para sequências de aminoácidos. A análise de cada região codificadora isoladamente indicou níveis de identidade nucleotídica para demarcação de espécies de 58% (P1) ou de 74 a 78% (demais genes) (ADAMS et al., 2005). Entretanto, uma comparação realizada em nível de aminoácidos revelou uma identidade média inferior de 70% para proteína capsidial, refletindo uma elevada flexibilidade evolutiva do grupo e sugerindo que os *Potyvirus* continuam a se adaptar às condições ambientais (CALLAWAY et al., 2001; NICOLINI et al., 2011). Uma análise com base em 1.220 sequências de proteínas capsidiais indicou um valor de 76 a 77% de identidade de nucleotídeos para a demarcação de espécies, o mesmo valor encontrado para as comparações baseadas no genoma completo (ADAMS et al., 2005).

1.1.4 *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

O *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*. Este vírus possui partícula alongada e flexuosa, de aproximadamente 715 x 13nm, o seu genoma é composto de uma única molécula de RNA de fita simples com aproximadamente 10.000 nt. O RNA genômico tem uma única fase de leitura (ORF), cuja tradução gera uma poliproteína de 340 KDa que sofre uma auto-proteólise a partir de três proteases virais, NIa, P1 e Hc-Pro, gerando oito a dez produtos finais (BERGER et al., 2005).

Na região nordeste do Brasil, este vírus é encontrado infectando diversas leguminosas, como feijão-caupi, feijão-de-praia (*Canavalia rosea*), amendoim (*Arachis hypogea*) e outras espécies distantes filogeneticamente, como espécies de maracujazeiros (*Passiflora sp.*) (PIO-RIBEIRO et al., 2000; KITAJIMA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2006, BARROS et al., 2011; NICOLINI et al., 2011).

Embora o CABMV possa ser transmitido por semente em caupi (SINGH et al. 1997), até o momento nenhum estudo comprova que este possa ser transmitido do mesmo modo em espécies de *Passiflora*. A transmissão natural é a mais importante forma de disseminação do vírus em caupi e no maracujazeiro, e é feita por várias espécies de pulgões como *Myzus persicae* Sulzer, *Aphis gossypii* Glover, *Aphis spiraeicola* Patch e *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (BOCK; CONTI, 1974; FAUQUET et al., 2005; FISCHER; REZENDE, 2008).

Os sintomas produzidos pelo CABMV em genótipos de caupi susceptíveis, geralmente constituem-se de clorose na região das nervuras alternando com manchas verde-escuro ao longo de todo o limbo foliar (BOCK; CONTI, 1974; PURCIFULL; GONSALVES, 1985). No Brasil, o controle do CABMV tem sido insatisfatório, devido ao alto custo dos defensivos agrícolas para controle dos afídeos nos plantios comerciais de feijão-caupi e também de maracujá; em outros casos a dificuldade do controle ocorre porque estas culturas estão associadas ao cultivo doméstico, onde os tratamentos culturais para controle dos patógenos não são levados em conta e acabam funcionando como verdadeiros depósitos de multiplicação do vírus.

Trabalhos relacionados a fontes de resistência e estudos da estrutura genética de isolados de CABMV são de fundamental importância para o sucesso na geração de variedades resistentes e consequente controle do vírus (PINTO et al., 2008). Até o

momento, apenas três genomas completos do CABMV foram sequenciados, sendo um genoma proveniente de um isolado do Zimbábue, infectando caupi (MLOTSHWA et al., 2002) e dois genomas de isolados provenientes do Brasil um infectando maracujá e o outro amendoim (BARROS et al., 2011). No maracujazeiro, alguns trabalhos de filogenia e variabilidade genética do CABMV já foram relatados (NASCIMENTO et al., 2004; 2006; BARROS et al., 2011; NICOLINI et al., 2011). Contudo, em caupi, apenas um trabalho com informações de filogenia e variabilidade genética de isolados do Brasil foi publicado recentemente (NICOLINI et al., 2011). Nicolini et al. (2011) tentando compreender as relações de adaptação do CABMV ao hospedeiro como um fator de evolução, sequenciaram o gene da capa proteica (CP) de cinco isolados de CABMV de caupi, provenientes do estado do Rio Grande do Norte e Pernambuco e compararam estas sequências com as obtidas de isolados de *Passiflora* e *Cassia hoffmannseggii*, uma leguminosa, coletados em diferentes regiões do Brasil.



Figura 6 - Planta de feijão-caupi com sintomas severo de infecção pelo CABMV.
Fonte: Autor da tese, 2011.

1.2 Importância do estudo da variabilidade genética dos vírus de planta.

Os vírus são considerados um dos mais importantes patógenos na agricultura. Infestações de viroses em áreas cultivadas são responsáveis por uma gama de efeitos, que podem resultar desde a redução da qualidade da colheita a completa devastação das áreas plantadas. O desenvolvimento de plantas resistentes a vírus é uma das estratégias mais promissoras para o manejo de doenças virais. No entanto, a natureza dinâmica das populações de vírus proporciona uma constante evolução de novos isolados dentro de uma espécie que podem adaptar-se cada vez mais ao novo hospedeiro, podendo levar desde a quebra de resistência do vírus a um determinado genótipo ao surgimento de uma nova espécie (MANSOOR et al., 2003; GE et al., 2007).

Desde que Yarwood (1979) apresentou os primeiros trabalhos sobre os efeitos dos vírus de plantas nos hospedeiros há mais de 30 anos, progressos significativos foram feitos para decifrar os mecanismos populacionais de adaptação dos vírus a quebra de resistência no hospedeiro. Estudos recentes indicam que a adaptação viral a um hospedeiro específico, é influenciada pela estrutura genética da população do vírus (D'URSO et al., 2000; JRIDI et al., 2006), o modo de propagação (transmissão mecânica ou transmissão vetorial) (SAMBADE et al., 2007; CERNI et al., 2008), biologia do vírus em relação à gama de hospedeiros (ex.: generalista ou especialista) (AGUDELO-ROMERO et al., 2008), e pressão de seleção imposta pelo genótipo do hospedeiro potencial (TAN et al., 2005; RICO et al., 2006).

Em geral, a ideia que se tem é que alguns vírus podem se adaptar rapidamente aos diferentes ambientes do hospedeiro. Por exemplo, a quebra de resistência por alguns isolados podem surgir durante um primeiro contato com um hospedeiro restritivo (HEBRARD et al., 2006; ACOSTA-LEAL; XIONG, 2008). Mesmo mutações para adaptações sistêmicas dos vírus em uma espécie de planta não hospedeira pode ocorrer espontaneamente e tornar-se fixa em uma população apenas com uma passagem inicial (TAN et al., 2005; RICO et al., 2006). Contudo, apesar do seu potencial para uma rápida adaptação ao hospedeiro, a maioria dos vírus de planta apresenta estabilidade genética alta, uma vez que tenham alcançado adaptação ecológica com o hospedeiro (ELANA et al., 2005).

Um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da diversidade genética, surgimento ou extinção de novas espécies de vírus, quebra de resistência em um determinado genótipo é o aparecimento de mutações, recombinações, rearranjos e

aquisição *de novo* de genes no genoma dos vírus que possuem material genético tanto de RNA quanto de DNA (CLUNE et al., 2008; GRAHAM et al., 2010). No caso das mutações, mensurar suas taxas em uma determinada espécie ou grupo de isolados de vírus é um fator chave para a compreensão da estrutura genética das populações ao longo do tempo. Pois os valores exatos das taxas de mutações são importantes para se chegar a uma estimativa mais precisa do grau de diversidade genética existente em uma determinada espécie ou grupo de isolado, e, conseqüentemente, compreender o potencial evolutivo. Entretanto, estas informações ainda são limitadas apenas para algumas poucas espécies de vírus de planta, especialmente àquelas de maior importância econômica e associadas às *commodities*.

A maior parte dos trabalhos sobre diversidade genética e evolução das populações virais em plantas tem sido realizada, principalmente, com vírus de RNA (ribovírus) (GARCIA-ARENAL et al., 2001; ROOSSINCK; SCHNEIDER, 2005; ELANA et al., 2008; NICOLINI et al., 2011). Este fato se deve porque a maioria dos vírus de plantas já estudados possuem o genoma composto de RNA, e vírus com esse tipo de genoma apresentam maior susceptibilidade ao surgimento de mutações genéticas (DOMINGO; HOLLAND, 1997; ELANA et al., 2005). Em média, a cada rodada de replicação os ribovírus apresentam razão de mutação na ordem de magnitude de 0,03 a 2 por genoma em relação ao DNA de seus hospedeiros (DRAKE; HOLLAND 1999; CHAO et al., 2002; ELANA et al., 2008). Para vírus de DNA, especialmente, os vírus com genomas grandes, como os dsDNAs (dupla fita de DNA), a razão de mutação por genoma é bem mais baixa com aproximadamente 0,003 por rodada de replicação (CHAO et al., 2002). Isto se deve, em parte, a capacidade de correção da DNA polimerase durante as etapas de replicação dos vírus de DNA, e no caso dos vírus de RNA estas mutações são resultado da falta de atividade de revisão da RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) (DRAKE; HOLLAND, 1999; MALPICA et al., 2002). Entretanto, os vírus de DNA com genomas pequenos, como os begomovírus que são constituídos de genoma do tipo ssDNAs (fita simples de DNA), as taxas de mutação são mais frequentes e possuem níveis próximos aos encontrados nos ribovírus (RANEY et al., 2004; DUFFY; HOLMES, 2008).

Isnard et al. (1998), analisando a variabilidade genética de um único isolado de *Maize streak virus* (MSV), da família *Geminiviridae*, em diferentes condições de passagem numa mesmo hospedeiro; observou um alto grau de variabilidade genética em níveis similares aos encontrados nos vírus de RNA. As altas taxas de mutações

encontradas nos vírus de RNA podem refletir uma estratégia evolutiva, embora muitos vírus de RNA estáveis geneticamente, como o *Tabacco etch virus* (TEV), um vírus com genoma de RNA fita simples senso positivo, pertencente à família *Potyviridae*, tenham conseguido adaptar-se ao seu hospedeiro ao longo dos tempos (SANJUAN et al., 2009).

Recentes análises filogenéticas indicam que mutações têm sido um importante fator evolutivo de algumas espécies de vírus de RNA e DNA. Apesar dos poucos estudos sobre estrutura genética e variabilidade das populações entre os vírus de DNA comparado aos vírus de RNA (GE et al., 2007), os altos níveis de mutação, especialmente encontrados entre os begomovírus, família *Geminiviridae*, talvez seja um dos fatores determinantes para explicar o grande número de espécies e *quasispecies* encontradas entre esse grupo de vírus. Contudo, a maior parte dos estudos com begomovírus mostram que a recombinação é o fator preponderante para explicar a grande variabilidade genética existente (PADIDAM et al., 1999; PITA et al., 2001; RIBEIRO et al., 2007).

No caso dos ribovírus de planta, estudos comprovam que as suas populações são bastante estáveis se comparados com os ribovírus que infectam animais, apesar dos relatos das altas taxas de substituição entre os vírus de RNA de planta (RODRIGUEZ-CEREZO et al., 1991; FRAILE et al., 1997; MARCO; ARANDA, 2005; HERRANZ et al., 2008; FARGETTE et al., 2008). Este comportamento peculiar pode estar relacionado, em parte, a seleção de espécies com elevada capacidade para inibir ou estabilizar a resposta do sistema de defesa do hospedeiro ao seu ataque, a existência de fortes gargalos durante a movimentação célula a célula, a existência de gargalos durante a transmissão mediada por vetor, ou diferenças no modo de replicação comparado ao ciclo lítico dos vírus de animais (FRENCH; STENGER, 2003; SARDANYÉS et al., 2009). No entanto, comparado aos vírus de RNA de animais, as informações disponíveis sobre a estrutura genética e diversidade das populações entre os fitovírus ainda é escassa e, conseqüentemente, estudos biológicos em condições controladas e a disponibilização de informações de sequências genômicas dos vírus de planta nos bancos de dados precisam ser cada vez mais ampliados.

1.3 Mecanismos de resistência derivada do patógeno

Há algumas décadas podia-se dizer que o controle de doenças causadas por vírus em plantas se restringia a alguns métodos, como: a termoterapia, cultura de meristemas, controle químico do inseto vetor, microenxertia, erradicação das plantas infectadas e proteção cruzada (FUCHS; GONSALVES, 2007). Com o desenvolvimento da genética e da biologia molecular e com o advento das técnicas de manipulação genética, outras possibilidades estão disponíveis, entre elas a transformação genética. Há que se ter em conta, no entanto, que todas as ações de controle, mesmo não envolvendo manipulação genética, continuam a serem válidas e essenciais, sendo de fundamental importância para o controle integrado de doenças virais.

Após a primeira demonstração da possibilidade de obtenção de resistência derivadas do patógeno (RDP), no trabalho pioneiro do grupo do Dr. Roger Beachy em que se observou resistência em plantas de tabaco transgênicas expressando o gene da capa proteica do *Tabacco mosaic virus* (TMV) (ABEL et al., 1986), diversas estratégias têm sido usadas para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ou imunes a vírus pelo uso da engenharia genética. Estas estratégias são baseadas em duas grandes classes: resistência mediada por proteínas e resistência mediada por silenciamento de RNA.

Atualmente, a maioria das plantas transgênicas resistentes a vírus disponíveis comercialmente podem ser consideradas resultado de resistência derivada do patógeno (RDP) a partir da expressão de genes virais truncados defectivos em células vegetais (PRINS et al., 2008). RDP é um fenômeno pelo qual plantas transgênicas contendo genes ou sequências de ácido nucleico de um parasita promove a proteção contra os efeitos prejudiciais dos patógenos relacionados (SANFORD; JOHNSTON, 1985; LOMONOSSOFF, 1995). Entre as proteínas virais mais usadas para RDP destacam-se, as replicases, proteínas de movimento, proteases e, na maioria das vezes, proteínas capsidiais (CP) (KUNIK et al., 1994; NORIS et al., 1996; HONG; STANLEY, 1996; DUAN et al., 1997; BRUNETTI et al., 1997, 2001; LUCIOLI et al., 2003; ANTIGNUS et al., 2004; CHELLAPPAN et al., 2004a; YANG et al., 2004; BONFIM et al., 2007). Em mamoeiro (*Carica papaya* L.), um grande avanço no controle do *Papaya ringspot virus* (PRSV), família *Potyviridae*, ocorreu com o desenvolvimento de plantas transgênicas, por Fitch et al. (1992), expressando o gene da proteína capsidial de PRSV que foi isolado pela primeira vez no Havaí (GONSALVES; ISHII, 1980). Os clones de

uma linhagem transgênica R0, foram altamente resistentes ao isolado de PRSV do Havaí em experimentos realizados em casa de vegetação (FITCH et al., 1992). Os experimentos de campo relevaram que as linhagens R0 e R1 também foram altamente resistentes aos isolados presentes no Havaí (CAI et al., 1999). Entretanto, testes realizados com isolados do Brasil e Taiwan apresentaram baixos níveis de resistência para estes isolados (SOUZA JÚNIOR; GONSALVES, 2005).

A eficácia prática da RDP para controlar vírus de plantas tem sido firmemente estabelecida através de numerosos estudos (NOINNET, 2001; TEPFER, 2002; BAULCOMBE, 2004; MACDIARMID, 2005; BUCHER et al., 2006; BONFIM et al., 2007; LEE et al., 2011). Na verdade, a resistência por expressão do gene da CP do patógeno alvo tem sido utilizada contra quase todas as famílias de vírus de plantas em diversas culturas, embora alguns estudos tenham relatado quebra de resistência ou diminuição de tolerância dependente da concentração de inóculo e diversidade genética da população do patógeno (SOUZA JÚNIOR; GONSALVES, 2005).

No entanto, ao longo da última década, estudos têm demonstrado que os mecanismos mais eficiente para a obtenção de plantas resistentes a vírus são mediados por RNA e ocorrem através do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) ou silenciamento de RNA (PRINS et al., 2008). O termo silenciamento gênico refere-se a uma série de mecanismos por meio dos quais a expressão de um ou mais genes ou molécula de ácido nucleico é regulada negativamente (BAULCOMBE, 2000; MATZKE et al., 2001). Este é um mecanismo conservado de regulação da expressão de mRNA em plantas, animais e fungos, e caracterizado pela degradação de mRNAs endógenos/transgênicos no citoplasma, levando à redução da expressão gênica (HERR, 2005). O componente unificador dos diferentes processos de silenciamento de RNA já estudados em diversos organismos é o RNA de fita dupla (dsRNA), que é reconhecido pela enzima Dicer e transforma o dsRNA em curtos fragmentos de 21 a 26 nt denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Estes pequenos RNAs são, então, incorporadas pelo 'Complexo de silenciamento induzido por RNA' (RISC). Em seguida, o RISC dirige a degradação de mRNAs endógenos que têm identidade com os pequenos RNAs (HANNON, 2002; NOVINA; SHARP, 2004).

Em plantas, o silenciamento de RNA controla inúmeros processos de desenvolvimento e é requerido para a regulação da acumulação viral. Nos primeiros estudos com plantas transgênicas resistentes a vírus, percebeu-se que o silenciamento de RNA representava um sistema ancestral de defesa contra vírus e retrotransposons

(LINDBO et al., 1993b; MANSOOR et al., 2006). Atualmente, sabe-se que este constitui também um mecanismo eficiente de regulação gênica, que atua principalmente no controle de genes envolvidos no desenvolvimento do organismo e na manutenção da integridade do genoma (DENLI; HANNON, 2003; MANSOOR et al., 2006; NIU et al., 2010).

Uma das primeiras funções biológicas propostas para o silenciamento de RNA foi estabelecida em plantas durante estudos sobre RDP (LINDBO et al., 1993b). A observação de que plantas recuperadas de uma primeira infecção viral tornavam-se resistentes à reinfeção pelo mesmo vírus, devido à ativação e manutenção do silenciamento, levou à hipótese de que o silenciamento de RNA seria uma resposta adaptativa de defesa contra vírus (AL-KAFF et al., 1998). Evidências adicionais foram obtidas com a observação de que plantas mutantes defectivas para o silenciamento são hipersensíveis à infecção por alguns vírus (MOURRAIN et al., 2000; MOREL et al., 2002; VOINNET, 2005), e pela descoberta de proteínas virais com capacidade de suprimir o silenciamento em plantas (ANANDALAKSHMI et al., 1998; BRIGNETI et al., 1998; PALUKAITIS; MACFARLANE, 2006; ZIEBELL et al., 2011) e animais (LI et al., 2002). A função do silenciamento de RNA na defesa contra vírus levou à sugestão de que o mecanismo funcionaria como um “sistema imune” do genoma. De forma análoga ao sistema imunológico presente em aves e mamíferos, o silenciamento de RNA é específico contra elementos exógenos, a resposta pode ser amplificada e desencadeia uma resposta massiva contra um invasor (nesse caso, uma molécula de ácido nucléico) (PLASTERK, 2002).

Uma das limitações da resistência mediada por RNA é a sua alta especificidade a sequências alvos de nucleotídeos, o que é um fator negativo para a resistência viral nas culturas (BAULCOMBE, 1996). Infecções mistas por vírus distintos ou até isolados que apresentem uma grande variabilidade genética podem superar a resistência mediada por RNA porque o silenciamento será atenuado ou inibido pelo supressor de silenciamento dos vírus não relacionados (NIU et al., 2006).

Prins et al. (1996) com o objetivo de avaliar plantas resistentes mediada por RNA construíram um cassete de interferência utilizando o gene N do *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e avaliaram se as linhagens obtidas de tomateiro também possuíam amplo espectro de resistência a outros tospovírus, como *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e o *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV). Eles avaliaram que apesar de haver entre estas espécies de tospovírus uma identidade de nt relativamente alta, de cerca de

78 a 80%, os níveis de resistência foram baixos para as demais espécies. Alguns anos mais tarde, Jean et al. (2000) construíram um transgene contendo duas sequências provenientes de dois vírus distintos, o potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV) e o tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), respectivamente. A expressão desse transgene conferiu resistência mediada por RNA contra algumas espécies não relacionadas. Similarmente, Bucher et al., (2006) demonstraram que plantas de tomateiro expressando um único e pequeno RNA *hairpin* contendo 4 segmentos do gene N (150 nt) de diferentes tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) e *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) apresentaram um amplo espectro de resistência.

Bonfim et al. (2007) utilizaram uma construção de RNA *hairpin* a partir de uma sequência conservada do gene *rep* do *Bean golden mosaic virus* (BGMV) com a finalidade de gerar feijoeiros transgênicos resistentes ao referido vírus. Num total de 18 plantas transgênicas obtidas, duas linhagens apresentaram imunidade ao BGMV. Testes de progênies avançados indicaram que, sob uma densidade populacional de mais de 300 moscas-brancas virulíferas por planta, em contato com as linhagens transgênicas por todo o ciclo de vida, 92,7% permaneceram sem sintomas. Testes de campo em diferentes regiões produtoras de feijão no Brasil com relatos da presença do BGMV, não identificaram o aparecimento de sintomas nas plantas transgênicas por nenhum dos isolados presentes nestas regiões (ARAGÃO; FARIA, 2009). Análises moleculares de um fragmento de 421 pb do genoma do BGMV usado para a construção do cassete de interferência mostrou que havia 100% de similaridade desta sequência entre os diferentes isolados analisados.

Trabalhos envolvendo infecções mistas de diferentes espécies de vírus têm avaliado o sinergismo existente entre as espécies de vírus e a capacidade da planta transgênica engenheirada para silenciamento por RNAi manter-se resistente. Nestes estudos, alguns mediadores sinérgicos de doenças virais são identificados, e sabe-se que eles agem suprimindo alguns componentes do mecanismo de silenciamento gênico. O efeito dessa supressão resultado da co-infecção com dois vírus diferentes leva ao aparecimento de sintomas muito mais graves do que a infecção com um único vírus. Muitos desses efeitos sinérgicos envolvem membro do gênero *Potyvirus* (ANANDALAKSHMI et al., 1998). Assim, Aragão e Faria (2009) investigando possíveis supressões de resistência em plantas transgênicas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) engenheiradas para o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) por co-inoculação

com o *Bean common necrotic mosaic virus* (BCNMV), gênero *Potyvirus*, ou com o *Bean rugose mosaic virus* (BRMV), gênero *Comovirus* e o BGMV, gênero *Begomovirus*, constataram que todas as plantas transgênicas infectadas com o BCNMV ou BRMV mantiveram a sua imunidade contra o BGMV.

2. OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Dentro do contexto previamente apresentado, esse trabalho teve o objetivo de estudar a variabilidade genética do *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) nas principais regiões produtoras de caupi com perspectiva para o desenvolvimento de estratégias de geração de genótipos resistentes a estes vírus pelo silenciamento por RNA interferente (RNAi).

2.1.2 Objetivos Específicos

- 1 – Sequenciar e caracterizar o fragmento genômico amplificado de diferentes isolados de CPSMV e CABMV provenientes das principais regiões produtoras.
- 2 – Realizar análise de filogenia e variabilidade genética entre os diferentes isolados de CPSMV e CABMV.
- 3 – Selecionar “in silico” uma sequência apropriada para construção de um vetor de RNAi para silenciamento do genoma do CPSMV e CABMV.

4.0 REFERÊNCIAS

ABEL P. P. et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, v.232, p.738-743, 1986.

ACOSTA-LEAL, R.; D XIONG, Z. G. Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco 'Virgin A Mutant' (VAM) to Potato virus Y. **Virology**, v. 379, p. 275-283, 2008.

ADAMS M.J.; ANTONIW, J. F, FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Arch. Virol.**, v.150, p.459–479, 2005.

AGUDELO-ROMERO, P.; ELENA, S. F. The degree of plant resilience to infection correlates with virus virulence and host-range. *Span. J. Agric. Res.* v.6, p.160–169, 2008.

AL-KAFF, N. S.; et al. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. **Science**, v. 279, p.2113–2115, 1998.

ALLISON, R.; JOHNSTON, R E.; DOUGHERTY, W. G. The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. **Virology**, v. 154, p. 9-20, 1986.

ANANDALAKSHMI R. et al. A viral suppressor of gene silencing in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 95, p.13079-13084, 1998.

ANTIGNUS, Y., R. et al. Truncated rep gene originated from Tomato yellow leaf curl virus-Israel (Mild) confers strain-specific resistance in transgenic tomato. *Ann. Applied Biol.*, v. 144, p. 39-44, 2004.

ARAGÃO, F, J. L; FARIA J. C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 1086 – 1088, 2009.

ARAÚJO, A. G. de; CARDOSO, M. J. Melhoramento do feijão macassar no Piauí, 1. Introdução e avaliação de cultivares e linhagens. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO PIAUÍ, 2., Teresina, 1980. **Anais...** Teresina: EMBRAPA-UEPAE de Teresina, 1981. p.67-75.

ASSUNÇÃO, I. P. et al. Genes diferentes podem conferir resistência ao Cowpea severe mosaic virus em caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 274-278, 2005.

BARRADAS, M.M.; SALAS, F.J.S.; BUITRÓN, I.P.G.; OLIVEIRA, J.M. Morfologia e transmissão de um vírus isolado de *Vigna luteola*. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 4., Campinas, 1991. **Anais...** Campinas: Estação Experimental do Instituto Biológico, 1991. p.13.

BARROS, D. R. Comparative analysis of the genomes of two isolates of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts. **Arch. Virol.**, v.156, p1085–1091, 2011.

BARROS, F. R.; et al.. Potencial genético de progênies de feijão caupi segregantes ao tipo da inflorescência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 182-189, 2011.

BASSO, J; DALLAIRE, P.; CHAREST, PJ.; DEVANTIER, Y.; LALIBERTE, J.F. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 3157-3165, 1994.

BAULCOMBE, D.. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **Plant Cell**,v. 8, p. 1833–1844, 1996.

BAULCOMBE, D.C.. Unwinding RNA silencing. **Science**, v. 290, p.1108-9, 2000.

BAULCOMBE, David. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, n.7006, p. 356-363, September, 2004.

BERGER, P. H et al. Vírus Taxonomy. **Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego. Elsevier Academic Press, 2005.

BERTACINI, P.V., et al.. Biological and physicochemical properties of cowpea severe mosaic *Comovirus* isolated from soybean in the State of Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.41, p.409-416, 1998.

BESERRA JR, J. E. A, et al. Sequence variability in the coat protein gene of *Cowpea severe mosaic virus* isolates from northeastern Brazil. **Tropical Plant pathology**, v.36, 2, p.121-124, 2011.

BEZERRA, A. A. de C. Variabilidade e diversidade genética em caupi (*Vigna unguiculatas(L)Walp.*) precoce, de crescimento determinado e porte ereto e semi-ereto,

Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1997. 105 f.. Dissertação de Mestrado.

BOCK, K. R.; CONTI, M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. Kew: CMI/AAB, 1974. 5 p. (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 134).

BONFIM K; FARIA J. C, NOGUEIRA, E. O. P. L, et al.. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Mol. Plant-Microbe Interact**, v.20, n.6, p.7–726, 2007.

BOOKER, H. M.; UMAHARAM, P.; MCDAVID, C. R. Effect of *Cowpea severe mosaic virus* on crop growth characteristics and yield of cowpea. **Plant Disease**, v. 89, n. 5, p. 515-520, 2005.

BRADSHAW J. D.; et al. Landscape epidemiology of *Bean pod mottle* comovirus: molecular evidence of heterogeneous sources. **Arch. Virol.**, v.156, p.1615–1619, 2011.

BRIGNETI, G; et al.: Viral pathogenicity determinants are suppressers of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **EMBO J.**, v.17, p. 6739-6746, 1998.

BRIOSO, P.S.T.; et al. Vírus do mosaico severo do caupi - Infecção natural em mungo verde, *Vigna radiata*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p.420-429, 1994.

BUCHER, E.; et al. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. **Journal of General Virology**, v.87, p. 3697–3701, 2006.

CAI, W.Q., et al, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.35, n. 1, p.61-69, 1999.

CALLAWAY, A.; et al The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. **Annual Review of phytopathology**, v. 39, p. 419-456, 2001.

CAMARÇO, R F E A.; et al. Biological, serological and molecular comparison between isolates of *Cowpea severe mosaic virus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n.4, p.239-244, 2009.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: levantamento. Brasília. 39p. 2012.

CERNI, S., et al. Stem pitting and seedling yellows symptoms of *Citrus tristeza virus* infection may be determined by minor sequence variants. **Virus Genes**, v. 36, p.241-249, 2008.

CHAO, L. C; RANG, U.; WONG, A. L. E.. Distribution of spontaneous mutants and inferences about the replication mode of the RNA bacteriophage f6. **J. Virol**, v.76, p.3276–3281, 2002.

CHELLAPPAN, P., M. V.; et al.. Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in cassava. **Plant Mol. Biol.**, v.56, p.601–611, 2004.

CHELLAPPAN, P.; VANITHARANI, R., FAUQUET, D. C. M. Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. **J. Virol**. v.78, p.7465–7477, 2004.

CHEN, X.; BRUENING, G. Cloned copies of cowpea severe mosaic virus RNAs: infectious transcripts and complete nucleotide sequence of RNA 1. **Virology**, v. 191, p.607- 18, 1992.

CITADIN, C. T; IBRAHIM, A. B.; ARAGÃO F. J. Genetic engineering in Cowpea (*Vigna unguiculata*): History, status and prospects. **GM Crops**.; v.2, n.3., Jun, 2011.

CLUNE, J.; et al.. Natural selection fails to optimize mutation rates in rugged fitness landscapes. **PLoS Comput. Biol.** v4, n.1000187, 2008.

COELHO, R.S.B., PIO-RIBEIRO, G. & ANDRADE, G.P. Controle genético da resistência em linhagem de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) ao vírus o mosaico severo do caupi.. 310 CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Fortaleza, CE. 1998. **Resumos**, 1998. p.315.

COSTA, C.L., et a.. *Cerotoma arcuata* (Oliv.) um crisomelídeo vetor do mosaico da *Vigna* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p.81-82, 1978.

D'URSO, F., et al. Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of *Citrus tristeza virus* (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. **Plant Pathol.**, v. 49, p.288-294, 2000.

DARÒS J. A.; CARRINGTON, J. C. RNA binding activity of NIa proteinase of *Tobacco etch potyvirus*. **Virology**, v.237, p.327–336, 1997.

DEBROT, C.E. de; ROJAS, C.E.B. El virus del moteado del frijol (*Vigna sinensis* Endl. (*Cowpea mosaic virus*) en Venezuela. **Agronomia Tropical**, v.7, p.3-15, 1967.

DENLI, A.M., HANNON, G.J.. RNAi: an ever-growing puzzle. **Trends Biochem. Sci.**, 28, 196–201, 2003.

DIPIERO, R. M.; et al. Transmissão do *Passionfruit woodiness vírus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 139-140, 2006.

DOMINGO E.; HOLLAND, J. J RNA virus mutations and fitness for survival. **Annu. Rev. Microbiol**, v.51, p.151–178, 1997.

DRAKE, J.W, HOLLAND J.J. Mutation rates among RNA viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 96, p.13910–13913, 1999.

DUAN, Y. P.; et al., Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing mutated BC1 protein. **Mol. Plant–Microbe Interact.**, v.10, p. 617–623, 1997.

DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. **J. Virol**, v.82, n. 2, p.957, 2008.

ELENA, S. F.; SANJUAN, R. On the adaptive value of high mutation rates in RNA viruses: separating causes from consequences. **J. Virol.**, v.79, p.555– 558, 2005.

ELENA, S. F., et al., Experimental evolution of plant RNA viruses. **Heredity**, v.100, p.478-483, 2008.

ELIEZER R. et al., Análise molecular de segmento do RNA2 de *Comovirus* isolados de soja no Estado do Paraná. **Fitopatol. Bras.**, v.27, n.5, set./out., 2002.

FARGETTE, D., A. et. al., *Rice yellow mottle virus*, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. **J. Virol.** v.82, p. 3584–3589, 2008.

FAUQUET, C. M., et al. Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean basins. **Phytopathology**, .v.9, 549–555, 2005.

FERNANDES, C.F. **Principais Doenças e Pragas do Feijão-de-Corda**. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=294>>. Acesso em: 17 dez. 2006.

FISCHER, I.H.; REZENDE, J. A. M. Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.). **Pest Tech**, v. 2, p.1–19, 2008.

FITCH, M.M., et al. Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus*. **Bio/Technology**, v.10, p.1466-1472, 1992.

FRAILE, A.; et al., Century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. **J. Virol.**, v. 71, p.8316-8320, 1997.

FREIRE FILHO, F. R. et al., BRS Marataoã: novo cultivar de feijão-caupi com grão tipo sempre-verde. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p.771-777, 2005.

FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; RIBEIRO, V. Q. Variabilidade genética e capacidade de combinação em feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) In: SEMINÁRIO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO PIAUÍ, 6., 1990, Teresina. **Anais...** Teresina: EMBRAPA-UEPAE de Teresina, 1992. p.219-227.

FREIRE FILHO, F. R.; SANTOS, A. A. dos; ARAÚJO, A. G. de; CARDOSO, M. J.; RIBEIRO, V. Q.; GOMES, S. M. F. Melhoramento do feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Piauí - período 1980-1983. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO PIAUÍ, 4., 1986, **Anais...** Teresina, 1986, Teresina, EMBRAPA-UEPAE de Teresina, 1986. p.204-229.

FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; RIBEIRO, V. Q. ATHAYDE SOBRINHO, C.; SILVA, P. H. S. da. Introdução, avaliação e utilização de germoplasma de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Relatório Técnico Anual da Unidade de Execução de Âmbito Estadual de Teresina 1990**. Teresina, p. 126-131, 1991.

FREIRE-FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A.G.; SANTOS, A. A.; SILVA, P. H. S. **Características botânicas e agronômicas de cultivares de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Teresina: EMBRAPA – UEPAE Teresina, 1981. 45 p. (EMBRAPA-UEPAE Teresina. Boletim de Pesquisa, 4).

FREIRE-FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2005. 519p.

FRENCH, R.; STENGER, D. C. Evolution of Wheat streak mosaic virus: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 41, p.199–214, 2003.

FUCHS, M.; GONSALVES, D. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.2007, p. 45:173–202, 2007.

FULTON, J. P. ; ALLEN, D. J. Identification of resistance to *Cowpea severe mosaic virus*. **Tropical Agriculture**, v.59, p.66-68, 1982.

GALLIE, D. R.; TANGUAY, R. L.; LEATHERS, V. The Tobacco etch Viral 5' Leader and Poly(A) Tail Are Synergistic Regulators of Translation. **Gene**, v. 165, p. 233-38. 1995.

GARCÍA-ARENAL, F.; RAILE, A; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 39, p.157–186.

GE, L.; ZHANG, J.; ZHOU, X.; LI, H. Genetic structure and population variability of *Tomato yellow leaf curl China virus*. **J Virol** , v.81, p.5902–5907, 2001.

GHORBANI, S. G. M.; SHAHRAEIN, N.; ELAGINIA, S. A. Serodiagnose of cowpea (*Vigna unguiculata*) viruses in Guilan province, Iran. **Iranian Journal Virology**, v. 01, n. 1, p. 28-31, 2008.

GOLDBACH, R.; REZELMAN,G.; VAN KAMMEN,A. **Nature**, v.286, p.297- 300, 1980.

GONÇALVES, M. F. B.; LIMA, J. A. A. Efeitos do *Cowpea severe mosaic virus* sobre a produtividade do feijão-de-corda. **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, p.547, 1982.

GONSALVES, D.; ISHII, M. Purification and serology of *Papaya ringspot virus*. **Phytopathology**, v.70, p.1028-1032, 1980.

GRAHAM, A. P.; MARTIN, D. P.; ROYE, M. E. Molecular characterization and phylogeny of two begomoviruses infecting *Malvastrum americanum* in Jamaica: Evidence of the contribution of inter-species recombination to the evolution of malvaceous weed-associated begomoviruses from the Northern Caribbean. **Virus Genes**, v.40, p.256–266, 2010.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v.418, p. 244-251, 2002.

HEBRARD, E., A.; et al.. Emergence of a resistance-breaking isolate of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein Vpg. **J. Gen. Virol.**, v.87, p.1369-1373, 2006.

HERRÁNZ, M.C.; et al., V. Low genetic variability in the coat and movement proteins of American plum line pattern virus isolates from different geographic origins. **Arch. Virol.**, v.153, p.367–373, 2008.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. Potyviruses. In: **Handbook of Plant Virus Infections: Comparative Diagnosis**, p. 731-807, 1981 a. Edited by E. Kurstak. Amsterdam, Elsevier/North-Holland.

HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. *Potyvirus* group. CMI/AAB **Descriptions of Plant Viruses**, n. 245, 1981b.

HONG, Y.; STANLEY, J. Virus resistance in *Nicotiana benthamiana* conferred by *African cassava mosaic virus* replication-associated protein (AC1) transgene. **Mol. Plant–Microbe Interact.**, v.9, p. 219–225, 1996.

HULL R. **Matthew's Plant Virology**. 4th Ed. London. Academic Press, 2002.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de recuperação automática. Banco de dados agregados**. Rio de Janeiro: Sidra 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 de set. 2011.

ISNARD, M., M. et al.. Quasispecies nature of three *Maize streak virus* isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p.3091–3099, 1998.

JRIDI, C.; MARTIN, et al.. Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. **J Virol**. v. 8, p.2349–2357, 2006.

KAREEM K. T.; TAIWO M. A. Interaction of viruses in cowpea: effect on growth and yield parameters. **Virology Journal**, v.4, p.15, 2007.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. p. 690-719. v. 2.

KITAJIMA E.W.; et al. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Brazil. **Arch. Virol.**, v. 153, p.743–747, 2008.

KLAS, F. E. *Cowpea severe mosaic virus: A constraint on the improvement of cowpea cultivation in Suriname*. **Paramaribo Agricultural Experimental Station Bulletin**, v. 104, p.22, 1979.

KRUTMAN, S.; VITAL A. F.; BASTOS, E. G. **Variedades de feijão macassar “*Vigna simensis*”: características e reconhecimento**. Recife: IPEANE, 1968. 46 p.

KUNIK, T., et al., Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. **Biotechnology**, v. 12, p.500-504, 1994.

LE GALL O. et al. Family Comoviridae. In: FAUQUET, C. M. et al. (Eds). **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, v. 807, p.818. 2005.

LEE, W. S.; et al. Genetic modification of alternative respiration in *Nicotiana benthamiana* affects basal and salicylic acid-induced resistance to *Potato virus X*. **BMC Plant Biology**, v. 11, p.41, 2011.

LI, H.; LI, W. X.; DING, S.W. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. **Science**, v. 296, p.1319-2, 2002.

LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; LIMA, R. C. A. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: FREIRE FILHO F. R.; LIMA J. A. A.; RIBEIRO V. Q. (Ed.) **Feijão-Caupi Avanços Tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005b. p 403-459.

LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; GONÇALVES, M. F. B.; BRITO, E.M. Isolado do vírus do mosaico severo do caupi capaz de infetar a cultivar Macaibo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 02, p. 186, 1992.

LIMA, J. A. A., GONÇALVES, M. F. B.; SANTOS, C. D. G. Diferenças e similaridades entre estirpes de *Cowpea severe mosaic virus* isoladas no Ceará e Piauí. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p.115-129, 1986a.

LIMA, J. A. A.; SANTOS, C.D.G. ; SILVEIRA, L. F. S. Comportamento de genótipos de feijão-de-corda em relação aos dois principais vírus que ocorrem no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p.151-161, 1986b.

LIMA, J. A. A., et al. Isolado do vírus do mosaico severo do caupi capaz de infectar a cultivar Macaibo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p.186. 1992. (Resumo).

LIMA, J. A. A.; et al. *Crotalaria paulinea*, novo hospedeiro natural do vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 429-433, 2005a.

LIN, M. T.; ANJOS, J. R. N.; RIOS, G. P. *Cowpea severe mosaic virus* in five legumes in Central Brazil. **Plant Disease**, v. 66, p.67-70, 1982.

LINDBO, J. A. et al. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. **Plant Cell**, v.5, p.1749-1759, 1993b.

LOMONOSSOFF, G. P. Pathogen-derived resistance to plant viruses. **Annual Review of Plant Pathology**, v.33, p.323-43, 1995.

LUCIOLI, A., et al. *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* Rep-derived resistance to homologous and heterologous geminiviruses occurs by different mechanisms and is overcome if virus-mediated transgene silencing is activated. **J. Virol.**, v. 77, p.6785-6798, 2003.

MACDIARMID, R. RNA silencing in productive virus infections. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.43, p. 523-44, 2005.

MALPICA J M. et al., The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. **Genetics**, v. 162, p. 1505-1511, 2002.

MANSOOR S.; et al., Engineering novel traits in plants through RNA interference. **Trends Plant Sci.**, v.11, p. 559-565, 2006.

MANSOOR, S., R.; et al. Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA beta. **Arch. Virol.**, v. 148, p.1969–1986, 2003.

MARCO, C. F.; ARANDA, M. A.. Genetic diversity of a natural population of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. **J. Gen. Virol.**, v,86, p.815–822, 2005.

MATZKE, M.; MATZKE, A. J.; KOOTER, J. M. RNA: Guiding gene silencing. **Science**, v. 293, p.1080-3, 2001.

MIRANDA, P.; et al.. Desenvolvimento de germoplasma de caupi para condições de sequeiro. In: EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Recife, PE). **Relatório de pesquisa apresentado a FACEPE: programação 1995/1996**. Recife: IPA, 1996. p.48-79.

MIRANDA, P.; et al.. Melhoramento genético do feijão caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Recife, PE). **Programa feijão: relatório anual de pesquisa 1992**. Recife: IPA/SEA/FACEPE/EMBRAPA, 1995. p.38-53.

MLOTSHWA, S.; et al., The genomic sequence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and its similarities with other potyviruses. **Arch. Virol.**, v. 147, 1043–1052, 2002.

MOREL, J. B.; et al. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in posttranscriptional gene silencing and virus resistance. **Plant Cell**, v. 14, p.629-39, 2002.

MOURRAIN, P.; et al., Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. **Cell**, v.101, p.533-542, 2000.

NASCIMENTO A.V. S, et al.. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Arch. Virol.**, v. 151, p.1797–1809, 2006.

NASCIMENTO A. V. S. et al. Análise filogenética de *Potyvirus* causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brazil. **Fitopatol Bras.**, v. 29, p.378–383, 2004.

NICOLINI, C.; et al.. Possible Host Adaptation as an Evolution Factor of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* Deduced by Coat Protein Gene Analysis. **J Phytopathol**, p. 1-6, 2011.

NIU QW, et al. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. **Nat. Biotechnol.** v.24, n.11, p.1420-1428, 2006.

NIU, J. H.; et al. RNAi technology extends its reach: Engineering plant resistance against harmful eukaryotes. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n.45, p. 7573-7582, 2010.

NORIS, E.; et al. Resistance to *Tomato yellow leaf curl geminivirus* in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. **Virology**, v. 224, p. 130-138, 1996.

NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. The RNAi revolution. **Nature**, v.430, p. 161-164, 2004.

OLIVEIRA, M. A. Contribuição ao estudo dos vírus causadores de mosaico no feijão macassar (*Vigna* spp). Instituto Agronômico do Sul (Pelotas). **Boletim Técnico**, v.1, p.1-36. 1947, 2004.

ORAWU, M. et al. Occurrence and prevalence of cowpea virus diseases in Uganda. **Africana Crop Science Proceedings**, v. 7, p. 1279-1283, 2005.

PADIDAM, M., S. SAWYER, AND C. M. FAUQUET. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p.218–225, 1999.

PAIVA, J. B.; et al. Melhoramento, experimentação e fitossanidade com feijão (*Vigna simensis*), realizadas no estado do Ceará (1967/68). **Pesquisa Agropecuária do Nordeste**, v.2, n.2, p.99-113, 1970.

PALUKAITIS, P.; MACFARLANE, S. **Viral counter-defense molecules. In Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses**, p. 165–185. Edited by G. Loebenstein & J. P. Carr. Netherlands: Springer Publishers, 2006.

PAZ, C. D.; et al.. Purificação de um isolado do vírus do mosaico severo do caupi, obtido em Pernambuco, produção de antissoros e determinação de fontes de resistência em caupi. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 285-188, 1999.

PHILIPS R. D. et al. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v. 82, p.193-213, 2003.

PINTO, P.H. D et. al. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV). **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, p.19-26.,2008.

PIO-RIBEIRO G, et al. Occurrence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in peanut in Brazil. **Plant Dis.**, v. 84, p.760–766, 2000.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, M. F.; ANDRADE, G. P. Doenças do caupi. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.3, 2005. P. 215-216.

PITA, J. S. et al. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **J. Gen. Virol.**, v. 82, p.655–665, 2001.

PLASTERK, R.H. RNA silencing: the genome's immune system. **Science**, v. 296, p.1263–1265, 2002.

PRINS, M., et al. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. **Molecular Plant Pathology**, v.9, p.73–83, 2008.

PRINS, M., et al. Engineered RNA-mediated resistance to *Tomato spotted wilt virus* is sequence specific. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 9, p.416–418, 1996.

PURCIFULL, D.; GONSALVES, D. *Blackeye cowpea mosaic virus*. **CMI/AAB Description of Plant Viruses**, n. 305, 1985.

RANEY, J. L.; DELONGCHAMP, R. R.; VALENTINE, C. R. Spontaneous mutant frequency and mutation spectrum for gene A of Φ X174 grown in *E. coli*. **Environ Mol Mutagen**, v. 44, p.119–127, 2004.

RANEY, J. L., R. R. DELONGCHAMP, AND C. R. VALENTINE. Spontaneous mutant frequency and mutation spectrum for gene A of Φ X174 grown in *Escherichia coli*. **Environ. Mol. Mutag.** v.44, p.119–127, 2004.

RIBEIRO, S.G.; LOHUIS, H.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. *Tomato chlorotic mottle virus* is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. **J. Virol.**, v.81, n.4, p.1563, 2007.

RICO, P. et al. Insights into the selective pressures restricting *Pelargonium* flower break virus genome variability: evidence for host adaptation. **J Virol**, v. 80, p. 8124–8132, 2006.

RIECHMANN, J. L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of *Plum pox potyvirus*. **Journal of General Virology**, v. 70, p.2785-2789, 1989.

RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; et al. High genetic stability in natural populations of the plant RNA virus tobacco mild green mosaic virus. **J. Mol. Evol.**, v.32, p.328–332, 1991b.

ROOSSINCK, M. J.; SCHNEIDER, W. L. Mutant clouds and occupation of sequence space in plant RNA viruses, p. 337–348. In E. Domingo (ed.), *Quasispecies*. **Springer-Verlag**, Berlin, Germany, 2005.

SAMBADE, A., et al. Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants co-inoculated with mild and severe variants. **Arch. Virol.** v.152, p.1115-1126, 2007.

SANFORD, J. C.; JOHNSTON, S. A. The concept of parasitederived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. **J. Theor. Biol.**, v. 113, 395-405, 1985.

SANJUÁN, R.; AGUDELO-ROMERO, P.; ELENA, S. F. Upper-limit mutation rate estimation for a plant RNA virus. **Biol. Lett.**, v.5, p.394–396, 2009.

SANTOS, A. A., FREIRE-FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J. BR 10 – Piauí: cultivar de feijão macassar (*Vigna unguiculata*) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p.400-402, 1987.

SARDANYÉS, J., R. V.; SOLÉ AND S. F. ELENA. Replication mode and landscape topology differentially affect RNA virus mutational load and robustness. **J. Virol.**, v. 83, p. 12579–12589, 2009.

SHUKLA, D. D., FRENKEL, M. J. & WARD, C. W. Structure and function of the *Potyvirus* genome with special reference to the coat protein coding region. **Can. J. Plant Pathol.**, v. 13, p.178–191, 1991.

SHUKLA, D. D.; WARD, C.W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: Academic Press, 1994.

SILVA, E.K.C. **Cowpea Severe Mosaic Virus: Diagnóstico, estudo de herança e identificação de marcadores moleculares associados à resistência**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SINGH, B. B.; et al.. **Advances in Cowpea Research**. Ibadan, JIRCAS/ITA. 1997.

SIOBAIN, D.; HOLMES, E. C.. Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. **J. Virol.**, v.82, n.2, p.957, 2008.

SOUTO, E. R. et al.. Análise molecular do segmento do RNA2 de *Comovirus* isolados de soja no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n.5, p. 525-527, 2002.

SOUTO, E. R.; et al..Análise molecular de segmento do RNA-2 de *Comovirus* isolado de soja no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p.525-527, 2002.

SOUZA JÚNIOR, MT. AND GONSALVES, D. Sequence similarity between the viral *cp* gene and the transgene in transgenic papayas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.5, p.479-486, 2005.

TAN, Z. Y., et al.. Mutations in *Turnip mosaic virus* genomes that have adapted to *Raphanus sativus*. **J. Gen. Virol.**, v.86, p.501-510, 2005.

TEPFER, M. Risk assessment of virus resistant transgenic plants. **Annu. Rev. Phytopatol.**, v.40, p.467-491, 2002.

THOMPSON, V. S. **Studies on resistance to cowpea mosaic virus in selected varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.)**. M.Sc. thesis. The Library, The University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad. 1977.

UMAHARAN, P.; ARIYANAYAGAN, R. P.; HAQUE, S. Q. Resistance to *Cowpea severe mosaic virus*, determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Euphytica**, v.95, p.49-55, 1996.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A.; BERNARDI, F. *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. **Virus Res.**, v. 74, 157–175, 2001.

VALE, C. C.; LIMA, J. A. A. Herança da imunidade da cultivar Macaibo de *Vigna unguiculata* ao vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 30-32. 1995.

VALE, C. C.; LIMA, J. A. A. Herança da imunidade da cultivar Macaibo de *Vigna unguiculata* ao vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.30-32, 1995.

VAN HOFF, H. A. Overbrenging van het *Cowpea mosaic virus* in Suriname. **De Suriname Landbouw**, v.11, p. 131-137, 1963.

VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, p.206–220, 2005.

WATT, E. E.; KUENEMAN, E. A.; ARAUJO, J. P. P. de. Achievements in breeding cowpeas in Latin America. In: S.R. Singh & K.O. Rachie (Eds.), **Cowpea: research Production and Utilization**. New York: John Wiley and Sons , 1985, p. 125–128.

Y.-M.; MAXWELL, D. P. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of Tomato mottle and bean dwarf mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 74, 23-31, 1993.

YANG, Y., T. et al.. Use of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) Rep gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. **Phytopathology**, v. 94, p.490–496, 2004.

YARWOOD, C. E. Host passage effects with plant viruses. **Adv. Virus Res.**, v.25, p.169-190, 1979.

ZIEBELL, H. et al. *Cucumber mosaic virus* and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. **Scientific Reports**, v. , p.187, 2011.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO CPSMV

1.0 INTRODUÇÃO

Um dos vírus mais importantes que infectam caupi no Brasil é *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), que pertence à família *Secoviridae*, gênero *Comovirus* (GONÇALVES; LIMA, 1982; LIMA et al., 2005; BOOKER et al., 2005). O CPSMV possui genoma composto por duas moléculas de RNA de fita simples senso positivo, chamado RNA1 e RNA2. Os RNAs genômicos têm uma pequena proteína covalentemente ligada à sua extremidade 5' UTR (proteína ligada ao genoma viral, VPg) e são poliadenilados nas extremidades 3' (CHEN; BRUENING, 1992). O genoma do CPSMV é expresso através da síntese e processamento proteolítico de uma poliproteína precursora. O RNA1 do CPSMV codifica cinco proteínas maduras necessárias para a replicação, sendo elas, da orientação 5' para 3', um cofator protease [Co-pro], uma helicase putativa [Hel], um VPg, uma protease [Pro], e uma RNA-polimerase RNA dependente [RDRP]); enquanto o RNA2 codifica uma proteína de movimento célula a célula [MP] e duas proteínas capsidiais, uma maior e outra menor (LOMONOSSOFF et al., 2001; LE GALL et al., 2005). CPSMV é facilmente transmitido mecanicamente, e na natureza se propaga de uma forma semi-persistente por vários besouros *Chrysomelidae*, entre eles *Ceratonia arcuata*, o vetor mais importante no Brasil (COSTA et al., 1978; LIMA et al., 2005b).

Uma alternativa interessante para o controle do CPSMV é o uso de cultivares resistentes. Uma estratégia atraente seria a utilização de plantas transgênicas engenheiradas para explorar o conceito da interferência de RNA (RNAi) com finalidade de silenciar genes virais (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO; FARIA, 2009). No entanto, RNAi é um mecanismo de silenciamento de genes sequência específica. Conseqüentemente, as informações sobre variabilidade genética dos genomas dos vírus alvos são de fundamental importância para a eficiência dessa ferramenta.

Apesar dos numerosos estudos sobre os vírus que infectam caupi, informações a respeito da diversidade e variabilidade do genoma do CPSMV ainda é bastante limitada (BESERRA Jr. et al., 2011). Neste estudo, o principal objetivo foi sequenciar parcialmente o genoma de RNA1 de isolados de CPSMV das principais regiões produtoras de caupi do Nordeste brasileiro.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Plantas com sintomas de infecção viral foram coletadas em diversas localidades de nove unidades da federação (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Distrito Federal). Durante a coleta, as amostras de folhas foram armazenadas imediatamente em sacos plásticos contendo papel umedecido, transportadas para o laboratório em uma caixa de isopor com gelo, e mantidas a -80 °C até sua utilização. A origem geográfica das amostras coletadas são mostrados na figura 7.

2.2 RNA Dot-blot

As amostras de feijão-capi coletadas foram primeiramente avaliadas quanto a presença do CPSMV por análise de Dot-blot, e posteriormente, selecionadas para o isolamento de RNA e clonagem dos fragmentos virais por RT-PCR no laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O RNA total foi extraído de plantas infectadas utilizando um tampão de extração, Trizol (Invitrogen). O RNA (50 µg) foi ressuspendido em 1 mM EDTA pH 8,0 a um volume final de 50 µl. Para isso foram adicionados 30 µl de 20X SSC e 20 µl de formaldeído 37%. As amostras foram incubadas por 30 min a 60 °C e mantidas em gelo até serem transferidas para uma membrana de nylon. A hibridização foi realizada conforme descrito anteriormente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A sonda foi construída a partir da amplificação do fragmento genômico de 2200 pb do isolado de CPSMV proveniente do município de Taíba-CE, utilizando os primers CSMVF2000 (5'-GAGAAGGGAATGCACTTTGATT-3') e CSMVR4400 (5'-AGATTATATTCCATAGGAAGTA-3'). O fragmento amplificado foi clonado em vetor pGEM-T-Easy (Promega) e digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* para gerar um fragmento 362 pb correspondendo a um fragmento da região da Helicase.

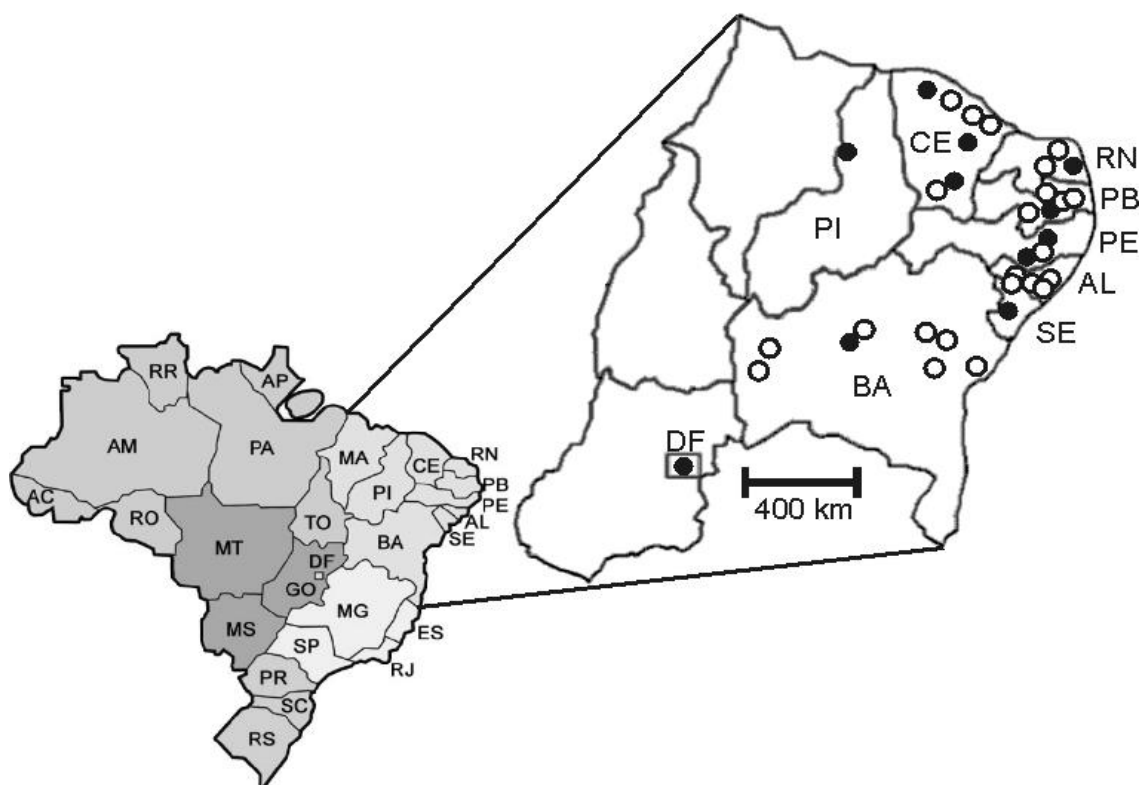


Figura 7 Mapa indicando as áreas onde foram coletadas as amostras de feijão-caupi. Os círculos preenchidos de cor preto representam as amostras coletadas e sequenciadas, e os círculos não-preenchidos representam as amostras coletadas e não sequenciadas.

Fonte: Autor da tese, 2011.

2.3 Extração de RNA e sequenciamento do fragmento de RNA 1

O RNA total foi extraído das plantas infectadas, previamente selecionadas, com o tampão de extração de RNA, Trizol (Invitrogen). Após a extração o RNA total foi utilizado para a síntese de fragmentos de cDNA por RT-PCR usando a enzima Superscript® Transcriptase Reversa III (Invitrogen). Para amplificação do fragmento de interesse foram sintetizados sete primers, sendo quatro no sentido *forward* e três no sentido *reverse*. Os primers sintetizados foram testados em todas as combinações possíveis e foi selecionada a combinação que amplificou o maior fragmento do CPSMV (Tabela 1). O segmento genômico de RNA1 do CPSMV selecionado foi amplificado

por PCR usando a combinação de primers CSMVF2000 (5'-GAGAAGGGAATGCACTTTGATT-3') e CSMVR4400 (5'-AGATTATATTCCATAGGAAGTA-3') com Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen). O produto desta amplificação resultou num fragmento de 2200 pb que correspondeu às sequências codificantes parcial do gene da helicase (Hel), VPg, 3C-like protease (Pro) e a sequência parcial da RNA polimerase RNA-dependente (RdRp). A amplificação por PCR foi realizada com um aquecimento inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação (94 °C / 1 min), anelamento (50 °C / 1 min) e extensão (68 °C / 4 min), seguido por uma extensão final a 68 °C por 10 min. Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). As sequências parciais de RNA1 obtidas foram depositadas no GenBank.

Tabela 1 - Primers usados para amplificação CPSMV em feijão-capi.

Primer	Orientação	Sequência (5'-3')
Primers CPSMV		
CSMVF1	Forward	ACGCATTAAACTACAATATGAAGTTCT
PCSMVF1	Forward	GCHTTYMGWAAYMGDMGACAYGT
PCSMVF2	Forward	TTGTKDNBATTGATGAYTTTGSTGCHGT
CSMVF2000	Forward	GAGAAGGGAATGCACTTTGATT
CSMVR1	Reverse	TGAACGCTCAGTAAGTTATCATCACC
CSMVR4400	Reverse	AGATTATATTCCATAGGAAGTA
CSMVR4800	Reverse	CTCATTGAAAATGCTGTTGCA

Fonte: Autor da tese, 2011.

2.4 Análises das seqüências

Os nucleotídeos e as sequências de aminoácidos foram alinhadas usando o programa Clustal W. A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA 5.1 usando o modelo Kimura para estimar as distâncias genéticas (Tamura et al., 2011). A árvore filogenética foi obtida utilizando o algoritmo de máxima verossimilhança com

1.000 bootstrap de repetição. Este estudo foi realizado para comparar individualmente as sequências de nucleotídeos e aminoácidos com isolados anteriormente relatados da mesma espécie ou com os isolados do mesmo gênero (sequências recuperadas do GenBank) para determinar a relação entre isolados brasileiros de CPSMV.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinquenta amostras foram coletadas em campos comerciais de feijão-capi em nove estados brasileiros (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Distrito Federal) correspondendo à região onde se concentra o cultivo de feijão-caupi (Figura 7). Todas as amostras foram inicialmente identificadas quanto à presença do CPSMV por RNA Dot-blot. Onze isolados foram escolhidos para sequenciamento com base nos sintomas (Tabela 2) e distribuição geográfica (Figura 7).

Tabela 2. Indicação dos municípios de origem dos isolados selecionados e sequenciados e sua correlação com o nível de sintomas observado para o CPSMV durante a coleta.

Municípios da coleta	Sintomas
Russas – CE	Fraco
Queimadas – PB	Moderado
Taquaritinga do Norte - PE	Moderado
Itabaianinha – SE	Moderado
Jupi – PE	Severo
Laranjeiras do Abdias – RN	Fraco
Brazlândia – DF	Moderado
Teresina - PI	Severo
Taíba – CE	Severo
Jaguaribe – CE	Moderado
Irecê – BA	Severo

Fonte: Autor da tese, 2011.

```

iyeiktwfhdsyhveatftsytgdllaycknkwehnteqeanlkqlgvkkesvafqqfr
sildlavfvnqdaenfkqrletpdgrchfvscydksgilrhytidatgdvqemekvdss
lddillektnkmvlaaykmikyhkdtnlviktqladlvdpkytadfqfdgvgisplfs
sqvmpsvkalplwqrmvlytvgqnlgrthsswyegikdkcmlalskaysteikdwpval
kivvgvilatvagkafwrfyasmadagngghfvgavasafagsqavvaqsrkpnrfdva
qyryrniplrkrnwaegqmsldqstmlimekckanfvsfniscqivmlpgrqflcykhv
faslnspmyvdiytankkyklyykpqnrvyfetedseimlykdasledipascwdlfcfd
aekslprgsfpaeilsckldrtnqhipewadisartvnqkldvefgeyqtifysylqy
dvstkaedcgsliaatidgrkkiigihtagranrsgfasympqveipvqaqaakffdf
lekeqhvtegigkvgnlkkgvwpplptktnlvetpkewhlgtektkepsilsstdlrlg
dkqydpfvvggiqkyaeppmgilddevlrvhvatdiveewfcdvdpqedtfeevdlqvaing
legmeymervpmatsegfphiltrksgekkgkgrfvygdgeifdlipgtsvheayltlee
tcadtvpalvgiecpkdekplrk

```

Figura 8 - Sequência de aminoácidos obtida a partir de análises *in silico* de um fragmento da poliproteína codificada pelo genoma RNA1 de CPSMV isolado da Taíba-CE. Helicase (Hel), Proteína ligada ao genoma viral (VPg), Picornain 3C-protease (Pro), RNA polimerase dependente de RNA (RpRd).

Fonte: Autor da tese, 2011.

A sequência de 2200 nt, que representa 1/5 do genoma completo do RNA1 do CPSMV, foi caracterizada e correspondeu a parte da região codificante do gene da helicase (Hel), do gene da proteína ligada ao genoma viral (VPg), picornain 3C-protease (Pro) e parte da RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) de CPSMV (Figura 8). O sequenciamento dos produtos de RT-PCR de RNA1 dos isolados de CPSMV revelaram identidade elevada, variando de 98 a 100% (Tabela 3). A amostra do isolado de Brazlândia-DF revelou identidade de 100% quando comparado com o isolado de Jaguaribe-CE. É importante considerar que a distância entre os dois municípios onde foram coletadas as amostras é de aproximadamente 1.800 km. A identidade de aminoácidos entre todos os isolados coletados também foi alta, variando de 96-100%. Resultados semelhantes foram observados para os isolados do *Bean pod mottle virus* (BPMV) infectando *Desmodium illinoense* nos EUA, em que uma identidade de ácido nucléico de 99,4 a 100% foi observada, com uma semelhança de

aminoácidos variando 98,5-99,4% em um fragmento de RNA1 (BRADSHAW et al., 2011). Além disso, um estudo recente determinou que a variabilidade em 521 nt do gene da proteína capsidial de seis isolados coletados durante um período de 32 anos de CPSMV foi também muito baixa, com identidade de ácido nucleico variando entre 97-100% e 92-100% nas seqüências de aminoácidos (BESERRA JR. et al., 2011), revelando que os isolados presentes no Brasil possuem baixos níveis de variabilidade genética (Tabela 3). Zhang et al. (2007) observaram a presença de RNA1 recombinante quimérico em BPMV infectando soja, revelando que a baixa variabilidade genética é observada em outras espécies de vírus do gênero *Comovirus*.

Considerando o fato de que foram analisadas amostras coletadas em locais distintos distribuídos em uma área de 1,2 milhões de quilômetros quadrados, e que a identidade entre as seqüências nucleotídicas variaram apenas entre 98 a 100% e de aminoácido de 96 a 100%, parece que a variabilidade observada no CPSMV é baixa (Tabela 3), o que nos encoraja a usar estratégias baseadas em RNAi para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a CPSMV. Provavelmente, efeitos gerados por uma alta variabilidade genética a qual essa população poderia estar sujeita, como a quebra de resistência, seriam minimizados o que permite o uso dessa ferramenta (RNAi) para a geração de plantas resistentes por toda a extensa área onde o feijão-caupi é produzido no Brasil.

Análise filogenética confirmou que os isolados brasileiros de CPSMV são substancialmente diferentes do isolado de CPSMV encontrado nos EUA (Figura 9). A robustez da filogenia resultante foi avaliada através da análise de bootstrap. Uma análise adicional com os fragmentos parciais de RNA 1 revelou uma separação clara entre isolados de Taíba-CE, Irecê-BA e Teresina-PI, que possuem um enraizamento formando um clado separado dos outros isolados brasileiros. Camarço et al. (2009) analisando a diversidade genética de dois isolados brasileiros de CPSMV comparado com um isolado da América Central e outras espécies do gênero *Comovirus*, observaram uma clara separação entre os isolados de CPSMV encontrados no Brasil, formando um clado a parte em relação aos demais, embora quando comparado as demais espécies de vírus do gênero, todos os isolados de CPSMV ficaram agrupados em um mesmo ramo da árvore formando um único clado. Na análise filogenética realizada no presente trabalho, não houve evidências de contrastes biológicos que poderiam estar associados a esta separação quando foram correlacionadas às distâncias genéticas entre os isolados e a

diferença de sintomatologia encontrada nas plantas coletadas nos diferentes municípios do nordeste brasileiro.

Tabela 3 - Porcentagem de identidade entre os nucleotídeos (diagonal acima) e aminoácidos deduzidos (diagonal abaixo) a partir da análise de sequências de um fragmento de RNA1 (2.200 nt) proveniente de 11 isolados brasileiros de CPSMV.

	TAI	TAQ	TER	QUE	ITA	LAR	BRA	JAG	RUS	JUP	IRE	USA
TAI		98	100	98	98	98	98	98	98	98	98	79
TAQ	97		98	100	99	99	100	100	99	99	99	79
TER	100	97		98	98	98	98	98	98	98	98	79
QUE	97	100	97		99	99	100	99	99	99	99	79
ITA	97	100	97	100		99	99	99	100	100	100	79
LAR	97	99	96	99	99		99	99	99	99	99	79
BRA	97	100	97	100	100	99		100	99	99	99	79
JAG	97	100	97	100	100	99	100		99	99	99	79
RUS	97	100	97	100	100	99	100	100		100	100	79
JUP	97	100	97	100	100	99	100	100	100		99	79
IRE	97	100	97	100	100	99	99	99	100	100		79
USA	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	

TAI: Taíba-CE; TAQ: 2: Taquaritinga do Norte-PE; TER: Teresina-PI; QUE: Queimadas-PB; ITA: Itabaianinha-SE; LAR: Laranjeira do Abdias-RN; BRA: Brazlândia-DF; TAG: Jaguaribe-CE; RUS: Russas-CE; JUP: Jupi-PE; IRE: Irecê-BA; USA: Estado Unidos da América.

Fonte: Autor da tese, 2011.

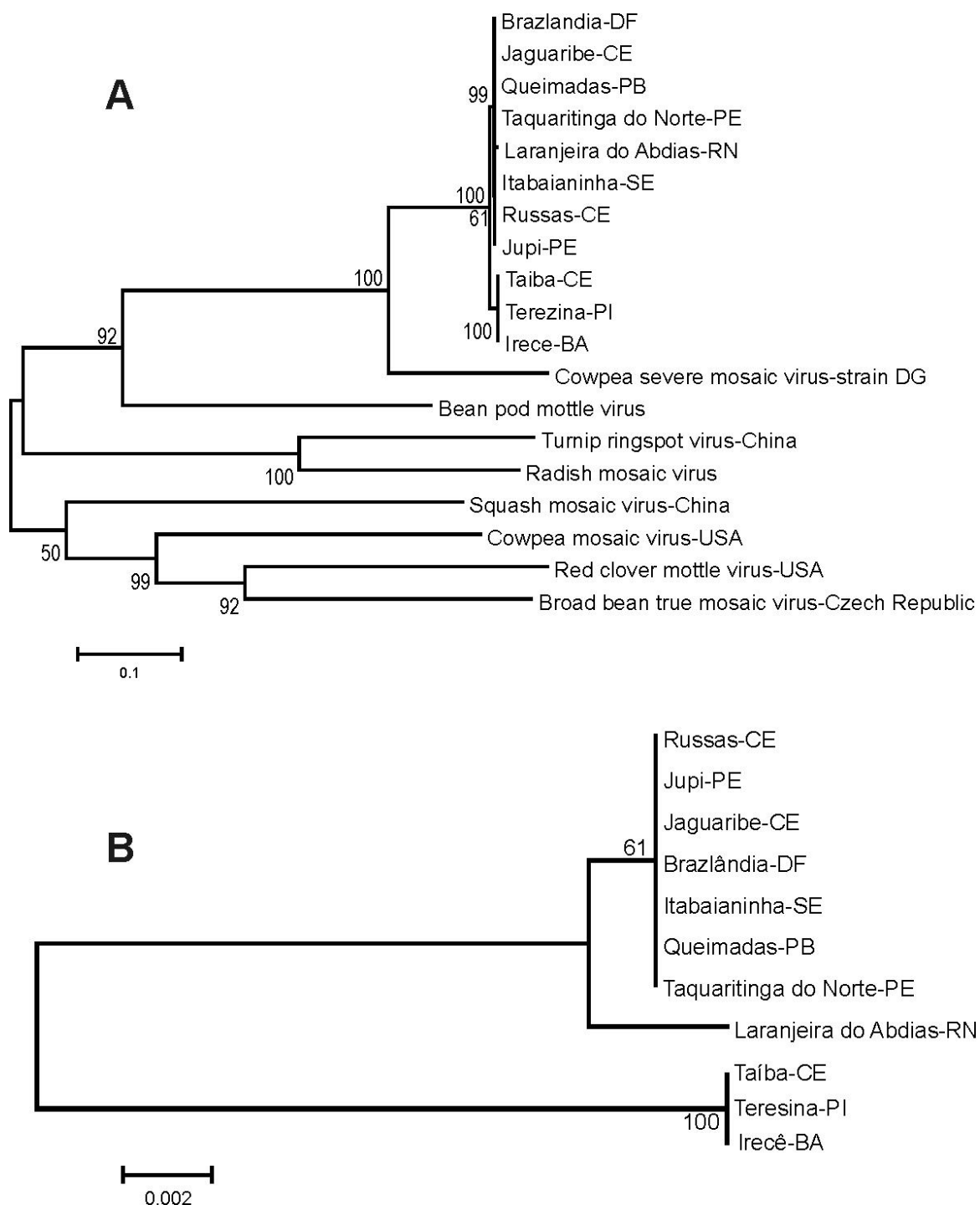


Figura 9 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos isolados de Cowpea severe mosaic virus e espécies do gênero Comovirus baseado em um fragmento do genoma de 2.200 nt do RNA1. (A). As sequências correspondentes às espécies de Comovirus foram retiradas de acessos depositados no GenBank: X00206 (Cowpea mosaic virus), AY744932 (Bean pod mottle virus), GU968732 (Turnip ringspot virus) X64886 (Red clover mottle virus), EU450837 (Radish mosaic virus), GU810903 (Broad bean true mosaic virus), M83830 (Cowpea severe mosaic virus) and EU421059 (Squash mosaic virus). Os valores de Bootstrap foram gerados a partir de 1.000 repetições e estão expressas nos nós. Em (B) a Árvore filogenética de 11 isolados brasileiros de

CPSMV correspondendo a um consenso proveniente de uma sequência de aminoácido deduzida de um fragmento genômico do RNA1 codificando uma poliproteína.

Fonte: Autor da tese, 2011.

Apesar da baixa variabilidade encontrada entre os isolados brasileiros de CPSMV coletados, há uma diferença notável em sua sintomatologia em plantas de feijão-caupi infectadas, variando de fraco a severo (Tabela 2). Para determinar as respostas dos hospedeiros aos isolados CPSMV, os sintomas nas plantas de caupi infectadas foram comparados utilizando uma escala de + (fraco) a + + + + (muito severo) (Figura 10). Em BPMV, sintomas determinantes têm sido associados com a protease cofactor (Co-pro) e helicase (Hel) (GU, GHABRIAL, 2005). No entanto, neste estudo, nenhuma correlação foi encontrada entre mutações na helicase e intensidade de sintomas causados pelo CPSMV, mas todos os isolados que apresentaram pelo menos uma mutação R e K na região codificadora da protease apresentaram sintomas graves (Figura 11).

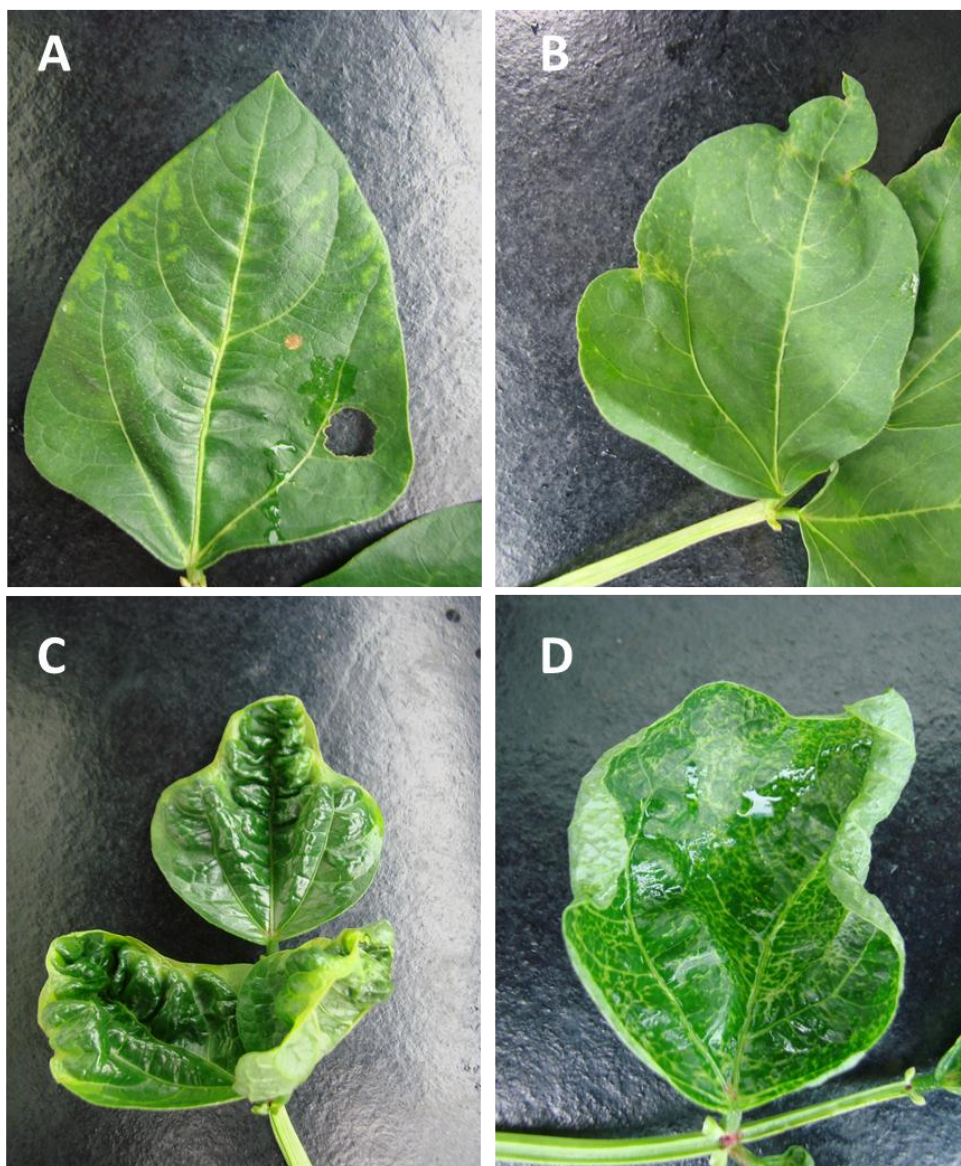


Figura 10 - Escala de sintomas de plantas infectadas pelo CPSMV coletadas. A. Sintoma fraco (+): planta apresentando cloroses leves no limbo foliar. B. Sintoma moderado (++) : planta apresentando cloroses leves no limbo foliar e o surgimento dos primeiros enrugamentos. C. Sintoma severo (+++) : planta apresentando clorose acentuada no limbo foliar, enrugamentos bastante evidentes e algumas bolhosidades. Sintoma muito severo (++++): planta apresentando clorose acentuada no limbo foliar, enrugamentos bastante evidentes e bolhosidades acentuadas.

Fonte: Autor da tese, 2011.

Sequências completas do genoma dos vírus correlacionado com respostas sintomatológicas do hospedeiro à infecção do patógeno devem ser analisadas a fim de se fazer uma melhor associação entre os aminoácidos e/ou variação da estrutura das proteínas com a presença dos diferentes níveis de sintomas entre os isolados existentes. Os resultados obtidos no presente estudo irão melhorar as observações a respeito da ocorrência natural e variabilidade genética entre os isolados de CPSMV, que é importante para a biologia da população de vírus e fornece uma base para a compreensão da dificuldade em identificar a resistência da doença pelo hospedeiro para o consequente controle da doença. Além disso, este estudo fornece informações que serão a base para o desenvolvimento de estratégias para a geração de linhagens resistentes ao CPSMV duráveis, seja por melhoramento clássico, ou dentro das nossas expectativas, por estratégias baseadas em tecnologias de sequência-dependentes, como a estratégia de obtenção de plantas resistentes por RNAi, tornando-se ainda mais crucial. Neste contexto, experimentos com a finalidade de gerar plantas transgênicas de feijão-caupi resistentes ao CPSMV estão em andamento.

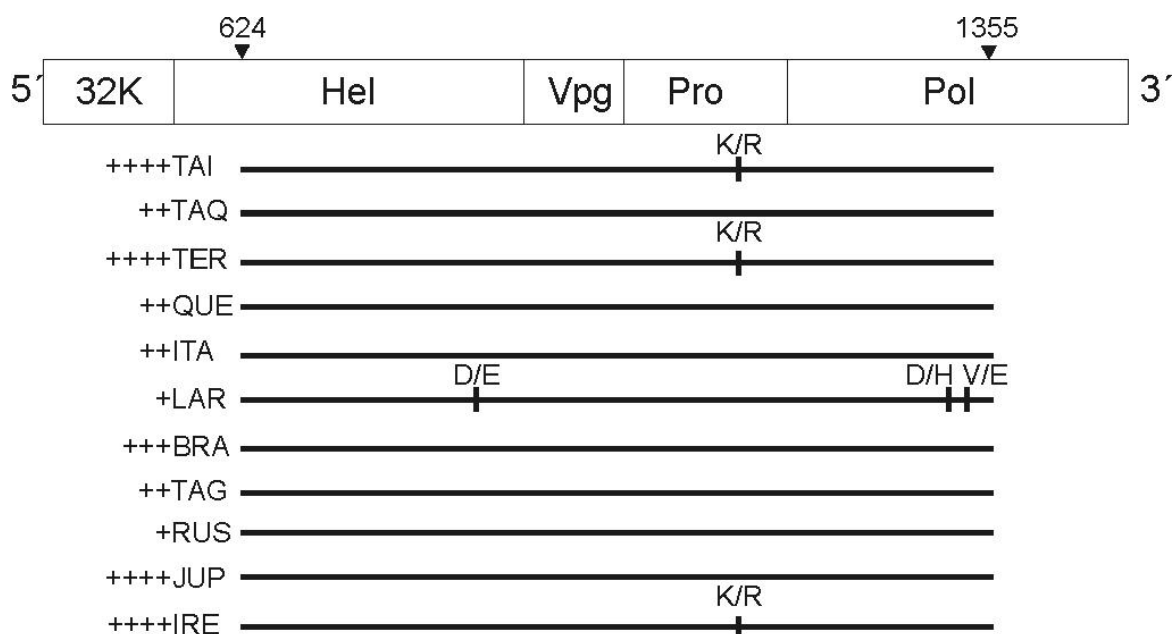


Figura 11 - Diagrama de organização do genoma de RNA1 do CPSMV e correlação das sequências com os isolados coletados. Divergência de distribuição de isolados do feijão-caupi coletados e sequenciados comparado às sequências consensos parciais da poliproteína do RNA1 de *Cowpea severe mosaic virus*, correspondendo a helicase (Hel), proteína viral ligada ao genoma (VPg), picornain 3C- protease (Pro) e

RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (aminoácidos 624 à 1355). As linhas verticais indicam as substituições de aminoácidos e severidade dos sintomas encontrados durante a coleta. Cada isolado apresenta seu escore de severidade dos sintomas de + (leve) a ++++ (severo). Os isolados foram por: TAI: Taíba-CE; TAQ: 2: Taquaritinga do Norte-PE; TER: Teresina-PI; QUE: Queimadas-PB; ITA: Itabaianinha-SE; LAR: Laranjeira do Abdias-RN; BRA: Brazlândia-DF; TAG: Jaguaribe-CE; RUS: Russas-CE; JUP: Jupi-PE; IRE: Irecê-BA.

Fonte: Autor da tese, 2011.

4.0 REFERÊNCIAS

ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v. 27, p.1086 – 1088, 2009.

BESERRA JR, J. E. A.; et al. Sequence variability in the coat protein gene of *Cowpea severe mosaic virus* isolates from northeastern Brazil. **Tropical Plant pathology**, v. 36, n.2, p. 121-124, 2011.

BONFIM, K.; et al. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 20, n. 6, p. 717–726, 2007.

BOOKER, H. M.; UMAHARAN, P.; MCDAVID, C. R. Effect of Cowpea severe mosaic virus on growth characteristics and yield of cowpea. **Plant Disease**, v. 89, p; 515-520, 2005.

BRADSHAW, J. D, et al.. Landscape epidemiology of *Bean pod mottle* comovirus: molecular evidence of heterogeneous sources. **Arch. Virol.**, v. 156:1615–1619. 2011

CHEN, X.; BRUENING, G. Cloned copies of cowpea severe mosaic virus RNAs: infectious transcripts and complete nucleotide sequence of RNA 1. **Virology**, v. 191, p.607- 18, 1992.

CAMARÇO, R F E A.; et al. Biological, serological and molecular comparison between isolates of *Cowpea severe mosaic virus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n.4, p.239-244, 2009.

COSTA, C.L.; LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; SANTOS, A.A.; MESQUITA, R.C.M.; FREIRE, F.R.F. *Cerotoma arcuata* (Oliv.) um Crisomelídeo vetor do mosaico da *Vigna* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.3, n.2, p.81-82, 1978.

GONÇALVES, M. F. B.;LIMA, J. A. A Efeitos do *Cowpea severe mosaic virus* sobre a produtividade do feijão-de-corda. **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, p.547, 1982 (Resumo).

GU, H.; GHABRIAL, S. A. The *Bean pod mottle virus* proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants. **Virology**, v. 333, n.2, p.271-83, 2005.

LE GALL O. et al. Family Comoviridae. In: FAUQUET, C. M. et al. (Eds). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, v. 807, p.818. 2005.

LIMA, J.A.A, et al. *Crotalaria paulinea* new natural host of the *Cowpea severe mosaic virus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n.4, p. 429-433, 2005b

LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M; LIMA, R. C. A. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: FREIRE FILHO, F. R; LIMA, J. A. A; RIBEIRO V.Q (Eds.). **Feijão-Caupi Avanços Tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2005, p. 403-459.

LOMONOSSOFF, G. P.; GHABRIAL, S. A. Comoviruses. In: MALOY, O.C.; MURRAY, T.D. (Eds). **Encyclopedia of Plant Pathology John Wiley and Sons**, New York, 2001. v. 1, p.239- 242.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, New York, USA, 2001.

TAMURA, K; et al. MEGA5.1: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol**, v. 4, p. 1-9, 2011.

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

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO CABMV

1.0 INTRODUÇÃO

O *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) é um importante vírus das culturas do caupi e do maracujá. No Brasil, e em muitos outros países do mundo, é responsável por causar grandes perdas nestas culturas. O CABMV pertence à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, é transmitido por várias espécies de afídeos na forma não persistente e não circulativa (BOCK; CONTI, 1974; FAUQUET et al., 2005; FISHER et al., 2005). O CABMV possui partícula alongada e flexuosa, de aproximadamente 715 x 13nm, o seu genoma é composto de uma única molécula de RNA de fita simples com aproximadamente 10.000 nt. O RNA genômico tem uma única fase de leitura (ORF), cuja tradução gera uma proteína que sofre uma auto-proteólise gerando de 8 a 10 produtos finais, que são: a proteína P1 na extremidade N-terminal da poliproteína, seguido pela proteinase HC-Pro, a proteína P3; uma primeira proteína de 6 KDa (6K1), uma proteína de inclusão cilíndrica (CI), a segunda proteína de 6 KDa (6K2); o domínio da proteína nuclear de inclusão, a VPg (NIA-VPG); um domínio da proteína A de inclusão nuclear (NIA-Pro), um domínio da proteína b de inclusão nuclear, a polimerase (N1b) e uma proteína capsidial (CP) (BERGER et al., 2005).

Pelo menos 200 espécies de potyvírus já foram identificadas, algumas das quais foram totalmente sequenciadas levando a uma melhor compreensão da estrutura do seu genoma, propriedades biológicas e suas relações evolutivas (SHUKLA et al., 1994; SITHOLE-NIANG et al., 1996; Barros et al., 2011). Os genes que codificam as proteínas são conservados na mesma ordem em todos os genomas de *Potyvirus* estudados. Trabalhos relacionados a fontes de resistência e estudos da estrutura genética de isolados de CABMV são de fundamental importância para o sucesso na geração de variedades resistentes e consequente controle do vírus (PINTO et al., 2008). Até o momento, em todo o mundo, apenas três genomas completos foram sequenciados, sendo um genoma proveniente de um isolado do Zimbábue que se encontrava infectando caupi e dois genomas de isolados do Brasil infectando maracujá (MLOTSHWA et al., 2002; BARROS et al., 2011). No maracujazeiro, alguns trabalhos de filogenia e variabilidade genética do CABMV já foram relatados (NASCIMENTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2006; BARROS et al., 2011; NICOLINI et al., 2011). Contudo, em caupi, apenas um trabalho com informações de filogenia e variabilidade genética de isolados do Brasil foi publicado recentemente (NICOLINI et al., 2011). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal obter sequências

parciais do genoma de diferentes isolados de CABMV das principais regiões produtoras de caupi para que estas informações possam auxiliar no desenvolvimento de variedades de caupi resistentes ao referido vírus. (mesmo comentário do capítulo anterior).

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material Vegetal

Plantas de feijão-caupi com diferentes níveis de sintomas com indicativo de infecção viral por CABMV foram coletadas em nove Estados do Brasil (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Distrito Federal). Durante a coleta, as amostras de folhas foram armazenadas imediatamente em sacos plásticos contendo papel umedecido, transportadas para o laboratório em uma caixa de isopor com gelo, e mantidas a -80°C até sua utilização. As origens geográficas dos isolados sequenciados podem ser vistas na Tabela 5.

2.2 RNA Dot-blot

As amostras de feijão-caupi coletadas foram primeiramente avaliadas quanto à presença do CABMV por análise de Dot-blot, e posteriormente, selecionadas para o isolamento e clonagem dos fragmentos virais por RT-PCR. O RNA total foi extraído de plantas infectadas com tampão de extração de RNA, Trizol (Invitrogen). O RNA (50 μg) foi ressuspensão em 1 mM EDTA pH 8,0 a um volume final de 50 μl . Para isso foi adicionado 30 μl de 20X SSC e 20 μl de formaldeído 37%. As amostras foram incubadas por 30 min a 60°C e mantidas em gelo até serem transferidas para uma membrana de nylon. A hibridização foi realizada conforme descrito anteriormente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A sonda foi construída a partir da amplificação de um fragmento de 997 pb do isolado de CABMV proveniente do município de Taíba-CE, utilizando os primers CABMVF (5'- TKGTGTGRTAGAYTTTGGCTTKAAAGT-3') e CABMV2R (5'- GTCAYCCCMARRAGRGWRTGCAT-3'). O fragmento amplificado foi clonado em vetor pGEM-T-Easy (Promega) e digerido com *EcoRI* para gerar uma sonda de 260 pb que correspondeu a um fragmento do gene da CI.

2.3 Extração de RNA e sequenciamento do fragmento de RNA

O RNA total das amostras selecionadas foi extraído dos tecidos infectados com reagente Trizol (Invitrogen), e depois foi utilizado para a síntese de fragmentos de cDNA por RT-PCR usando a enzima Superscript[®] Transcriptase Reversa III (Invitrogen). Para amplificação do fragmento de interesse foram sintetizados oito primers, sendo quatro no sentido *forward* e quatro no sentido *reverse*. Os primers sintetizados foram testados em todas as combinações possíveis e foi selecionada a combinação que amplificou o maior fragmento do CABMV (Tabela 4). O segmento genômico do RNA de CABMV foi parcialmente amplificado por PCR usando os primers CABMVF (5'- TKGTTGTGRTAGAYTTTGGCTTKAAAGT-3') e CABMV2R (5'- GTCAYCCCMARRAGRGWRTGCAT-3') utilizando Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen). O fragmento amplificado de nucleotídeo de 997 pb correspondeu à sequência codificante parcial da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) e a sequência parcial do gene da proteína 6K2. A amplificação por PCR foi realizada com um aquecimento inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação (94 °C / 1 min), anelamento (50 °C / 1 min) e extensão (68 °C / 4 min), seguido por uma extensão final a 68 °C por 10 min. Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). As sequências parciais de RNA obtidas foram depositadas no GenBank.

Tabela 4 - Primers usados para amplificação dos isolados de CABMV de feijão-caupi.

Primer	Orientação	Sequência (5'-3')	Referência
Nib 2F	Forward	GTITGYGTIGAYGAYTTYAAAYAA	Zheng et al. (2010)
CN48F	Forward	TCGTGIATHGANAATGG	Zheng et al. (2010)
CABMVF	Forward	TKGTTGTGRTAGAYTTTGGCTTKAAAGT	Novo
CABMV1R	Reverse	ATACACAAATCTCGGTAGCTACGCGTG	Novo
CABMV2R	Reverse	GTCAYCCCMARRAGRGWRTGCAT	Novo
CABMV3R	Reverse	GCRGCAGTGTGYCTCTCWGTRTTYTC	Novo
Oligo dT	Reverse	T ₂₂	Comercial

Fonte: Autor da tese, 2011.

2.4 Análises das seqüências

Os nucleotídeos e as seqüências de aminoácidos foram alinhadas usando o programa ClustalW. A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA 5.1 usando o modelo Kimura para estimar distâncias genéticas (TAMURA et al., 2011). A árvore filogenética foi obtida utilizando o algoritmo de máxima verossimilhança com 1.000 bootstrap repetições. Este estudo foi realizado para comparar individualmente as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos com isolados anteriormente relatados da mesma espécie ou com os isolados do mesmo gênero (seqüências recuperadas do GenBank) para determinar a relação entre isolados brasileiros de CABMV.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas cinquenta amostras provenientes de campos comerciais e domésticos de feijão-caupi em nove estados brasileiros (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Distrito Federal) (Tabela 5). Das cinquenta amostras coletadas e previamente identificadas quanto à presença do CABMV por RNA Dot-blot, dez amostras foram escolhidas para a extração do RNA total, clonagem e sequenciamento do fragmento genômico dos possíveis isolados. Também foram coletadas quatro amostras de acessos do BAG maracujá (Banco Ativo de Germoplasma) da Embrapa Mandioca e Fruticultura que apresentavam sintomas claros de infecção pelo CABMV. Entretanto, dentre as dez amostras de caupi selecionadas só foi possível sequenciar quatro isolados, e das amostras de maracujá sequenciou-se apenas dois isolados, obtendo um total de seis amostras para o estudo de diversidade genética (Tabela 5).

Tabela 5 - Regiões de coleta do feijão-caupi que foram sequenciados e sua associação com o nível de sintoma encontrado.

Municípios da coleta	Sintomas
Taíba- CE	Ausente
Jaguaribe - CE	Severo
Maravilha – AL	Ausente
Taquaritinga do Norte – PE	Ausente
BAG Maracujá Cruz das Almas I - BA	Severo
BAG Maracujá Cruz das Almas II – BA	Severo

Fonte: Autor da tese, 2011.

```

KKNVSYGERIQRLGRVGRHKPGFALRIGSTERGLTEIPEFIATEAAFLSFAYGLPVTTQNVTTN
ILSKCTVQQAKSALNFELTPFFTTHFVKYDGSMPHPEIHKLLKPFKLRESEMVMNKKAI PYQYVN
QWISVREYRRLGIQIGCDERVQLPFYVNGIPDKLFEALWDTVSKYRYDAGFGRISSTSSTKISY
TLSTEPTAIPRTVAIIDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHSFSLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNI
ETLQQAAROLLEFNSNNVDVKNLHEYEDLGI LNTVCLQSKQEVAKYLGLRGKWDGRRLRNDLLL
VIFTVIGGGWMM

```

Figura 12 - Sequência deduzida de aminoácidos obtida a partir da análise in silico do fragmento de 997 pb clonado do genoma do CABMV isolado da Taíba-CE. Sequência parcial da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) e da proteína 6K2.

Fonte: Autor da tese, 2011.

As sequências de 997 pb obtidas dos seis isolados foram caracterizadas e corresponderam à sequência codificante de parte da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) e a sequência parcial do gene da proteína 6K2 (Figura 12). A caracterização molecular comprovou a identidade dos seis isolados analisados como sendo estirpes do CABMV. As sequências de aminoácidos (aa) e nucleotídeos (nt) dos seis isolados obtidos revelaram identidade relativamente elevada, variando de 84 a 99% de nt e 91 a 99% de aa (Tabela 6). Os limites estabelecidos para esta família é de 76% de identidade de nt e

82% de identidade de aa (ICTV, 2011). Quando se compara a identidade de nt e aa somente entre os isolados de caupi, esses valores foram ainda mais altos, variando de 93 a 99% para nt e 96 a 99% para aa, e entre os dois isolados de maracujá a identidade foi de 99% para ambos. Contudo, ao compararmos a identidade de nt e aa entre os isolados de caupi e maracujá os valores de identidade foram muito abaixo dos encontrados anteriormente, variando de 84 e 85% para nt e 91 e 92% para aa (Tabela 6). A identidade entre os isolados do Ceará foi de 94 e 98% de nt e aa, respectivamente. E a identidade entre os isolados do Pernambuco e Alagoas foi de 99% entre as sequências de nt e aa, revelando um alto índice de identidade entre estes dois isolados. Por outro lado, quando comparamos a identidade entre os isolados do Ceará com os de Pernambuco e Alagoas, estes valores foram menores, variando de 93 a 95% de nt e 96 e 97% de aa, evidenciando uma correlação geográfica associada a baixos níveis de variabilidade genética encontrada entre os isolados (Tabela 6). Resultados semelhantes foram observados por Nascimento et al. (2006), em que análises a partir de sequências da capa proteica (CP) revelaram uma baixa variabilidade genética entre os isolados de CABMV de maracujá próximos geograficamente. Por outro lado, nem todos os trabalhos de variabilidade genética entre isolados de CABMV têm corroborado para essa afirmativa. Um estudo recente a partir da sequência completa do gene da CP determinou que a variabilidade entre isolados de CABMV de maracujazeiro próximos geograficamente nem sempre apresentavam índices de variabilidade mais altos quando comparados com alguns isolados geograficamente mais distantes (NICOLINI et al., 2011).

É importante ressaltar, que o presente trabalho utilizou o gene da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI) ao invés do gene da CP para correlacionar a identidade entre os isolados de CABMV. Entretanto, Adams et al. (2005) após estudos em que procuraram estabelecer um critério molecular mais preciso para discriminação taxonômica de espécies da família *Potyviridae*, identificou que na ausência da ORF completa de uma determinada espécie ou grupo de isolados, a forma mais precisa para este tipo de diagnóstico deve utilizar o gene da CI. Pareceres recentes encaminhados ao ICTV tem utilizado este critério para classificar novas espécies de vírus da família *Potyviridae* e tem sido aceito (ICTV, 2011). Portanto, esta região deverá também ser aceita como critério para estes tipos de estudos do que a usual CP.

Tabela 6 - Porcentagem de identidade entre os nucleotídeos (diagonal acima) e aminoácidos deduzidos (diagonal abaixo) a partir da análise das sequências do fragmento genômico (997 nt) provenientes de 6 isolados brasileiros de CABMV.

	TAQ	MAR	JAG	TAI	BG7	BG28	ZIM	MG	BR1
TAQ		99	95	93	84	84	88	93	93
MAR	99		95	93	84	84	88	93	93
JAG	97	97		94	84	84	89	93	93
TAI	96	96	98		85	85	89	93	93
BG7	91	91	92	92		99	85	84	84
BG28	91	91	92	92	99		85	84	84
ZIM	94	94	95	94	92	92		89	89
MG	95	95	96	96	92	92	95		100
BR1	95	95	96	96	92	92	95	100	

TAQ: 2: Taquaritinga do Norte-PE; MAR: Maravilha-AL; JAG: Jaguaribe-CE; TAI: Taíba-CE; BG7: BAG Maracujá 07 Cruz das Almas -BA; BG28: BAG Maracujá 28 Cruz das Almas-BA; ZIM: Zimbabwe; MG: Isolado de Maracujá-Brasil; BRI: Isolado de Amendoim-Brasil.

Fonte: Autor da tese, 2011.

Considerando o fato de que analisamos amostras coletadas em locais distintos distribuídos em uma área de 1,2 milhões de quilômetros quadrados, e que as identidades entre as sequências nucleotídicas variaram entre 84 a 99% e de aminoácido entre 91 a 99%, parece que a variabilidade observada entre os seis isolados de CABMV é alta. Entretanto, se forem comparados somente os isolados provenientes do mesmo hospedeiro os níveis de variabilidade são baixos (Tabela 6), fato este extremamente relevante para o desenvolvimento de estratégias de obtenção de plantas transgênicas resistentes ao CABMV pelo silenciamento do vírus na planta por RNAi. Provavelmente, efeitos gerados por uma alta variabilidade genética a qual essa população poderia estar sujeita, como a quebra de resistência, serão minimizados, o que permite o uso dessa

ferramenta (RNAi) para a geração de plantas resistentes por toda a extensa área onde o caupi é produzido no Brasil.

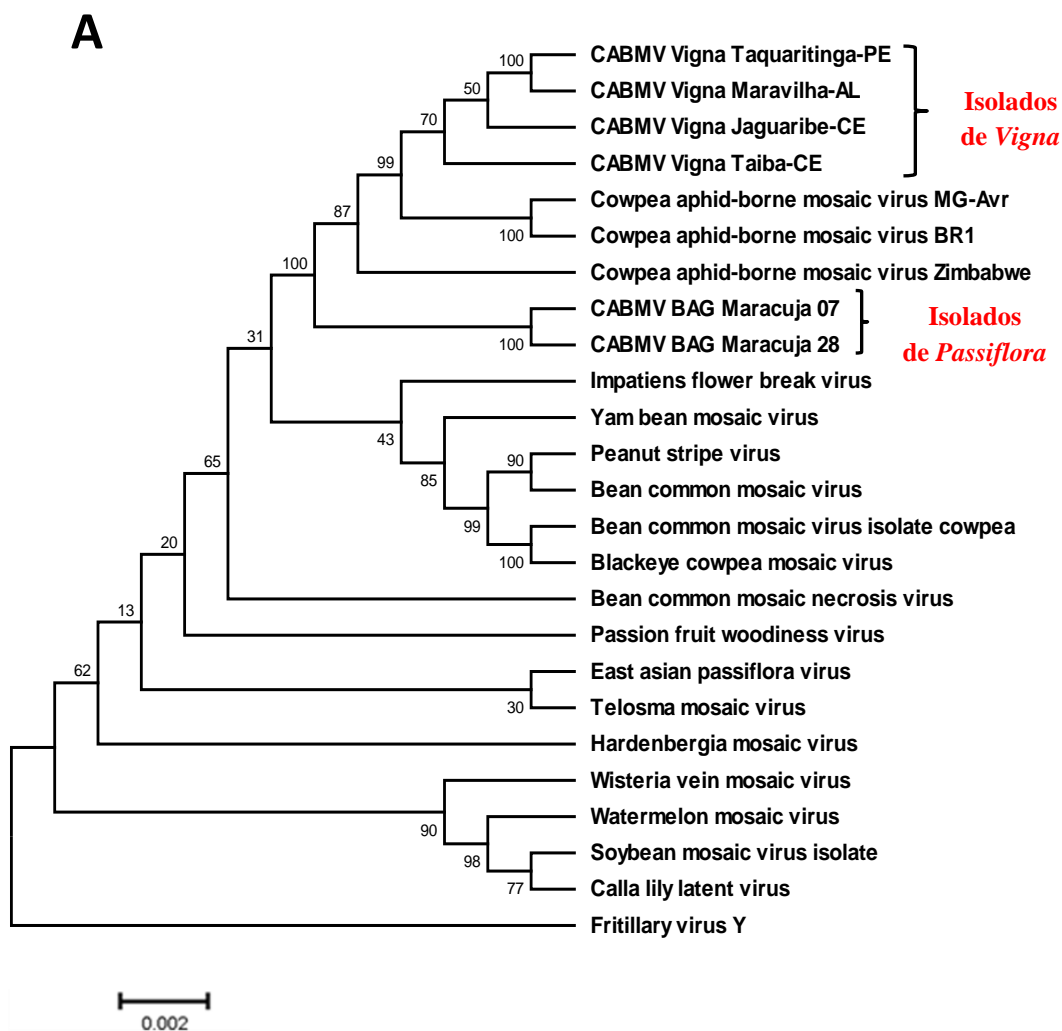
A análise filogenética confirmou que os isolados brasileiros de CABMV são substancialmente próximos do isolado de CABMV encontrado no Zimbábue (Figura 13), formando um grande clado à parte dos demais vírus da família *Potyviridae*. Surpreendentemente, o isolado de PWV que, no Brasil, juntamente com o CABMV, é um dos agentes causadores do endurecimento dos frutos, apresentou uma distância genética muito grande em relação aos isolados de CABMV, ficando separado em único clado (Figura 13).

Uma análise adicional com os fragmentos parciais do RNA viral revelou uma separação clara associada à distribuição geográfica entre isolados de Taquaritinga-PE e Maravilha-AL que possui um enraizamento formando um clado separado dos outros isolados brasileiros. Porém, entre os isolados do Ceará não pode se observar um enraizamento único (Figura 13). Para os isolados provenientes de *Passiflora*, a distância filogenética entre os isolados de caupi foi ainda maior (Figura 13). A robustez da filogenia resultante foi avaliada através da análise de bootstrap com 1000 repetições. Nicolini et al. (2011) analisando a diversidade genética entre os diferentes isolados de CABMV já sequenciados a partir da CP e tentando correlacionar essa variabilidade com adaptações evolutivas do patógeno aos diferentes hospedeiros, observaram uma clara separação entre os isolados de CABMV de acordo com o hospedeiro em que o vírus foi encontrado, formando clados à parte em relação aos demais. Em contraste, análises comparativas do genoma de dois isolados de CABMV provenientes de diferentes hospedeiros, indicaram que a distância genética entre os isolados não está relacionada à gama de hospedeiros do qual este vírus é encontrado e sim a sua origem geográfica (BARROS et al., 2011).

Embora tenha sido observada uma baixa variabilidade genética entre os isolados brasileiros de CABMV coletados, não foi possível correlacionar o grau de severidade dos sintomas apresentados durante a coleta do material vegetal com as mutações presentes. Vale ressaltar que, durante as coletas, apenas a amostra de caupi proveniente de Jaguaribe-CE apresentou sintoma claro da presença do vírus, nas demais amostras apesar de ser detectado por RT-PCR o CABMV predominaram os sintomas do CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*). Esta informação é de grande relevância para futuros estudos epidemiológicos de ambas as doenças no feijão-caupi, em que se observa numa

infecção múltipla a predominância dos sintomas apenas para o CPSMV. Este efeito pode estar associado ao sinergismo existente entre o CABMV e os demais vírus, especialmente os vírus do gênero *Comovirus*. Taiwo et al. (2007) observaram em linhagens de feijão-caupi susceptíveis às doenças virais, que ao se induzir infecção simples com o CABMV havia um claro aparecimento dos sintomas 10 dias após a inoculação, entretanto, quando induziu-se infecção mista com o CABMV e o CMeV (*Cowpea mottle virus*), um vírus do gênero *Comovirus*, havia predominância dos sintomas do CMeV, e este apresentava uma severidade mais elevada quando comparado à sua infecção simples em linhagens susceptíveis.

Sequências completas do genoma dos vírus estudados correlacionadas com respostas sintomatológicas do hospedeiro às infecções simples e mistas dos referidos patógenos devem ser analisadas a fim de se fazer uma melhor associação entre a variação da estrutura das proteínas e/ou sequência de nucleotídeos com o sinergismo entre os isolados existentes.



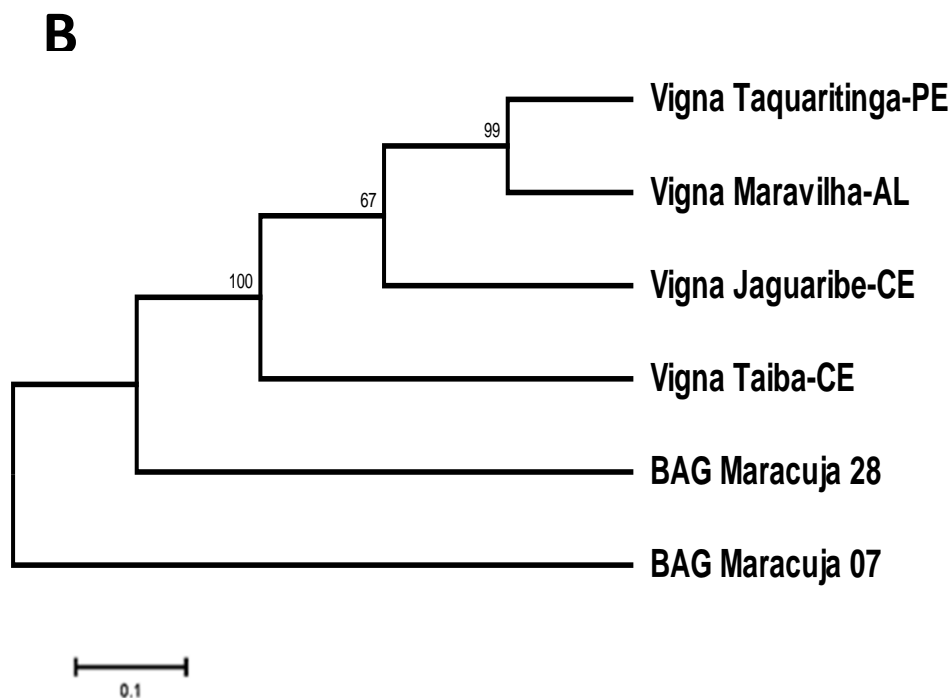


Figura 13 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos isolados de Cowpea aphid borne mosaic virus e espécies do gênero *Potyvirus* baseado em um fragmento do genoma de 997 nt do RNA viral. (A). As sequências correspondentes às espécies de *Potyvirus* foram retiradas de acessos depositados no GenBank: HQ880243 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* MG Avr), HQ880242 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* Br1), AF348210 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* Zimbabwe) AY864851 (*Impatiens flower break virus*), NC_016441 (*Yam mosaic virus*) PSU05771 (*Peanut stripe virus*), EU761198 (*Bean common mosaic virus*), AJ312437 (*Bean common mosaic vírus- Isolate cowpea*), AY575773 (*Blackeye cowpea mosaic virus*), HQ229994 (*Bean common mosaic necrosis virus*), HQ122652 (*Passion fruit woodiness vírus*), AB246773 (*East asian passiflora vírus*), DQ851493 (*Telosma mosaic virus*), HQ161080 (*Hardenbergia mosaic vírus*), AY656816 (*Wistéria vein mosaic vírus*), JF273466 (*Watermelon mosaic virus*), FJ640973 (*Soybean mosaic vírus*), EF105298 (*Calla lily latente vírus*), AM039800 (*Fritillary vírus* Y). Os valores de Bootstrap foram gerados a partir de 1.000 repetições e estão expressas nos nós. Em (B) a Árvore filogenética corresponde a um consenso proveniente de uma sequência parcial de aminoácido deduzida de um fragmento genômico que codifica a proteína CI e um fragmento pequeno da proteína 6K2 de seis isolados brasileiros de CABMV.

Fonte: Autor da tese, 2011.

O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos dos isolados de CABMV permitiu mapear os motivos conservados presentes nas diferentes proteínas produzidas durante a infecção da planta por *Potyvirus* (Figura 14). Na região codificadora da proteína CI foi encontrado o motivo conservado GERIQRLGRVGR e TNI em todos os isolados de CABMV (Figura 14), que estão relacionados com as atividades de RNA helicase e sítio de ligação de ATP, respectivamente (FERNANDEZ et al., 1997; MLOTSHWA et al., 2002). Também foram detectados nos isolados de caupi e maracujá o sítio de clivagem da CI/6K2, NTVCLQ/S (MLOTSHWA et al., 2002). Entretanto, observou-se nos isolados de maracujá uma substituição pontual de um resíduo de Asparagina (N), por um resíduo Treonina (T) (Figura 14). Ambos resíduos de aminoácidos apresentam características químicas semelhantes, portanto, provavelmente a mutação observada no sítio de clivagem CI/6K2 envolve aminoácidos que provavelmente não afetam o reconhecimento da sequência pela protease NIa-Pro. Contudo, estudos futuros com a obtenção de clones infecciosos e a utilização de mutagênese serão necessários para averiguar se os diferentes aminoácidos encontrados na sequência dos isolados de CABMV de maracujá tem algum papel na diferenciação biológica existente entre os isolados de maracujá e caupi.

Os resultados obtidos no presente trabalho irão auxiliar nos estudos epidemiológicos e diversidade genética entre os isolados de CABMV. Além disso, este trabalho fornece informações que serão a base para o desenvolvimento de estratégias para a geração de linhagens resistentes duráveis ao CABMV, seja por melhoramento clássico, ou dentro das nossas expectativas, por estratégias baseadas em tecnologias de sequência-dependentes, como a estratégia de obtenção de plantas resistentes por RNAi.

```

Maravilha-AL      KKGVSYSYGERIQRLGRVGRHKPGFALRIGSTERGLTEIPEFIATEAAFLSFAYGLPVTTQN 60
Taquaritinga-PE KKSVSYSYGERIQRLGRVGRHKPGFALRIGSTERGLTEIPEFIATEAAFLSFAYGLPVTTQN 60
Jaguaribe-CE     KKSVSYSYGERIQRLGRVGRHKPGFALRIGSTERGLTEIPEFIATEAAFLSFAYGLPVTTQN 60
Taíba-CE         KKGVSYSYGERIQRLGRVGRHKPGFALRIGSTERGLTEIPEFIATEAAFLSFAYGLPVTTQN 60
Maracujá07       KKSVSYSYGERIQRLGRVGRHKPGFALRIGSTERGLTEIPEFIATEAAFLSFAYGLPVTTQN 60
Maracujá28       KKSVSYSYGERIQRLGRVGRHKPGFALRIGSTERGLTEIPEFIATEAAFLSFAYGLPVTTQN 60
** .*****:*****:*****

Maravilha-AL      VTTNILSKCTVQQAKSALNFELTPFFTTTHFVKYDGSMPHEIHKLLKPFKLRSEEMVMNKK 120
Taquaritinga-PE VTTNILSKCTVQQAKSALNFELTPFFTTTHFVKYDGSMPHEIHKLLKPFKLRSEEMVMNKK 120
Jaguaribe-CE     VTTNILSKCTVQQAKSALNFELTPFFTTTHFVKYDGSMPHEIHKLLKPFKLRSEEMVMNKK 120
Taíba-CE         VTTNILSKCTVQQAKSALNFELTPFFTTTHFVKYDGSMPHEIHKLLKPFKLRSEEMVMNKK 120
Maracujá07       VTTNILSKCTVQQAKSALNFELTPFFTTTHFVKYDGSMPHEIHKLLKPFKLRSEEMVMNKK 120
Maracujá28       VTTNILSKCTVQQAKSALNFELTPFFTTTHFVKYDGSMPHEIHKLLKPFKLRSEEMVMNKK 120
*****.*****:*****:*****

Maravilha-AL      AIPYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCEVQLPFYVNGIPDKLFEALWEIVSKYRYDAGFG 180
Taquaritinga-PE AIPYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCEVQLPFYVNGIPDKLFEALWEIVSKYRYDAGFG 180
Jaguaribe-CE     AIPYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCDERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKYRYDAGFG 180
Taíba-CE         AIPYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCDERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKYRYDAGFG 180
Maracujá07       AIPYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCDERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKYRYDAGFG 180
Maracujá28       AIPYQYVNQWISVREYRRLGIQIGCDERVQLPFYVNGIPDKLFEALWETVSKYRYDAGFG 180
*****.*****:*.*:*.*:*****:*****

Maravilha-AL      RISSASSTKISYTLSTEPTAVPRTIAI IDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHSFSLSGIA 240
Taquaritinga-PE RISSASSTKISYTLSTEPTAVPRTIAI IDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHSFSLSGIA 240
Jaguaribe-CE     RISSASSTKISYTLSTEPTAVPRTIAI IDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHSFSLSGIA 240
Taíba-CE         RISSASSTKISYTLSTEPTAVPRTIAI IDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHSFSLSGIA 240
Maracujá07       RISSASSTKISYTLSTEPTAVPRTIAI IDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHSFSLSGIA 240
Maracujá28       RISSASSTKISYTLSTEPTAVPRTIAI IDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHSFSLSGIA 240
****.*****:*.*:*.*:*****:*****

                                     CI/6K2
Maravilha-AL      EGIRKRYLRDYSTQNIETLQARSQLEFNSNNDVNVNKLHEYEDLGILNTVCLQSKQEVA 300
Taquaritinga-PE EGIRKRYLRDYSTQNIETLQARSQLEFNSNNDVNVNKLHEYEDLGILNTVCLQSKQEVA 300
Jaguaribe-CE     EGIRKRYLRDYSTQNIETLQARAQLEFNSNNDVNVNKLHEYEDLGILNTVCLQSKQEVA 300
Taíba-CE         EGIRKRYLRDYSTQNIETLQARSQLEFNSNNDVNVNKLHEYEDLGILNTVCLQSKQEVA 300
Maracujá07       EGIRKRYLRDYSTQNIETLQARSQLEFNSNNDVNVNKLHEYEDLGILNTVCLQSKQEVA 300
Maracujá28       EGIRKRYLRDYSTQNIETLQARSQLEFNSNNDVNVNKLHEYEDLGILNTVCLQSKQEVA 300
*****.*****:*.*:*.*:*.*:*.*:*****

Maravilha-AL      KYLGLKQKWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 332
Taquaritinga-PE KYLGLKQKWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 332
Jaguaribe-CE     KYLGLKQKWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 332
Taíba-CE         KYLGLKQKWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 332
Maracujá07       KYLGLKQKWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 332
Maracujá28       KYLGLKQKWDGRRLRNDLLLVIFTVIGGGWMM 332
*****.*****:*.*:*****:*.*:*.*:*.*:

```

Figura 14 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos da proteína Inclusão Cilíndrica (CI) e parte da proteína 6K2 codificada pelo genoma dos isolados de CABMV provenientes de caupi e maracujá coletados em diferentes regiões produtoras no Nordeste Brasileiro. O sítio de clivagem CI/6K2 está indicado em verde. Os motivos conservados presentes na região codificadora da proteína CI estão indicados em vermelho. As mutações presentes na região de clivagem CI/6K2 e nas demais regiões estão marcadas em azul. Os asteriscos indicam posições conservadas de aminoácido entre os isolados.

Fonte: Autor da tese, 2011.

4.0 REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Arch Virol** ,v.150:459–479, 2005.

BONFIM, K.; et al. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 20, n.6, p. 717–726, 2007.

BERGER, P. H.; et al.. *Vírus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press,. 2005

BARROS D. R.; et al. Comparative analysis of the genomes of two isolates of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) obtained from different hosts. **Arch Virol**, v. 156, p.1–7, 2011.

BOCK, K.R. and CONTI, M. **Cowpea aphid-borne mosaic virus**. Kew: CMI/AAB, . 5p. (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 134).

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (2005) **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. London: Elsevier Academic Press.1259p.

MLOTSHWA, S.; et al.. The genomic sequence of cowpea aphid-borne mosaic virus and its similarities with other potyviruses. **Arch Virol**.,v. 147, p.: 1043–1052, 2002.

FERNÁNDEZ, A.; et al. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. **Nucleic Acids Research**, v.. 25, n. 22, p.4474 – 4480, 1997.

FISHER, I. H.; (Ed.), et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005, p.467-474.

NASCIMENTO, A.V.S, et al.. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.378–383, 2004.

NASCIMENTO, A.V.S. et al., Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Arch Virol.**, v. 151, p.1797–1809, 2006.

NICOLINI, C.; et al. Possible Host Adaptation as an Evolution Factor of Cowpea aphid-borne mosaic virus Deduced by Coat Protein Gene Analysis. **Journal of Phytopathology**. p.1439-0434, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning, A Laboratory Manual,, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, New York, USA, 2001.

SITHOLE-NIANG D. D.; et al. Sequence of the 3' terminal of a Zimbabwe isolate of Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). **Arch Virol**, p. 141:935–943, 1996.

PINTO, P. H. D.; et al. Reação de génotipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV). **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, 19-26, 2008.

SHUKLA, D. D.; WARD, C.W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: Academic Press, 1994.

TAIWO, M.A.; et al.. Cowpea viruses: effect of single and mixed infections on symptomatology and virus concentration. **Virology Journal**, New Orleans, v. 4, p. 95. 2007.

TAMURA K.; et al **MEGA5**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**; v.4, p.1-9, 2011.

ZHENG, L.; et al. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. **Plant Pathology**, v. 59, p.211–220, 2010.

CAPÍTULO IV

**DETERMINAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DO CPSMV E CABMV PARA USO
NA OBTENÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES VIA ESTRATÉGIAS DE
RNAI**

1 INTRODUÇÃO

O silenciamento baseado em RNAi é um processo altamente específico, que exige um elevado grau de homologia da sequência do transgene em relação a sequência alvo. A utilização de RNAi para o desenvolvimento de variedades de plantas resistentes a viroses tem revelado que algumas moléculas de siRNA (pequenos RNAs interferentes) geradas a partir de um *hairpin*-dsRNA direcionados à diferentes alvos de um mesmo RNA genômico viral são mais eficientes que outras.

Como mencionado no capítulo I, dentro da célula vegetal, os dsRNAs são capturados pelo complexo proteico DICER e a partir desse processo de reconhecimento inicial uma cascata de proteínas e complexos proteicos são acionados para auxiliar em todas as demais etapas do processo de silenciamento do vírus alvo. Para o reconhecimento inicial da dupla fita de RNA, induzida pelo transgene, é necessário que esta estrutura apresente um elevado grau de estabilidade termodinâmica. Assim, a caracterização da estabilidade termodinâmica das sequências de CPSMV e CABMV estudadas no presente trabalho passa a ser um procedimento indispensável no processo de escolha de uma alvo para o silenciamento por RNAi.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análise termodinâmica das sequências obtidas

Para análise termodinâmica, as sequências obtidas dos diferentes isolados de CPSMV e CABMV foram alinhadas no programa ClustalW. Como as análises de identidade em ambas as espécies de vírus foram bastante elevadas, acima dos 84%, foram selecionados os fragmentos genômicos amplificados dos isolados de CPSMV e CABMV do município de Taíba-CE. Estes fragmentos genômicos foram subfragmentados em 150 pb e analisados no software livre Mfold (ZUKER et al., 1999), disponível no site: www.mfold.rna.albany.edu. O programa visa calcular a diferença de

energia livre de Gibb's (G; -kcal/mol) das sequências propostas. Quanto mais negativo for o valor de G para uma determinada sequência, mais estável ela é.

Inicialmente, foi analisado no software Mfold cada subfragmento selecionado dos dois vírus, individualmente, e verificado a possibilidade de formação de grampo em cada fragmento selecionado a partir dos valores calculados pela energia livre de Gibb's. Posteriormente, os fragmentos de CPSMV e CABMV com menor possibilidade de formação de grampo foram selecionados e uma segunda análise de estabilidade termodinâmica com as sequências de ambos os vírus foram organizadas em *Tandem* no sentido senso e antisenso contendo entre elas uma sequência de 20 pb do intro pdk (Piruvato desidrogenase quinase) para favorecer a formação do *hairpin*-dsRNA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise termodinâmica dos segmentos genômicos do CPSMV e CABMV

Nas análises termodinâmicas para identificação do fragmento genômico de CPSMV mais adequado para construção do cassete de interferência o fragmento genômico que apresentou maior energia livre (G) foi encontrado na região da Protease (Pro), em um segmento de 150 pb, como representado abaixo.

```
TGCTCGCACTGTGAATCAGAACTAGATGTTGAATTTGGAGAATATCAGACCATTTTCTATTCT
TATCTGCAATATGATGTCCCCACAAGAGCAGAGGACTGTGGCTCTCTCATCATTGCAACTATTG
ATGGAAGAAAGAAAATTGTGG
```

A estrutura tridimensional do fragmento genômico indicada na figura 15 apresentou o maior valor de energia livre de Gibb's entre todos os segmentos genômicos avaliados, $\Delta G = - 29,10$ kcal/mol. De acordo com os princípios da termodinâmica, quanto menos negativo for a energia livre encontrado menos espontânea é a reação.

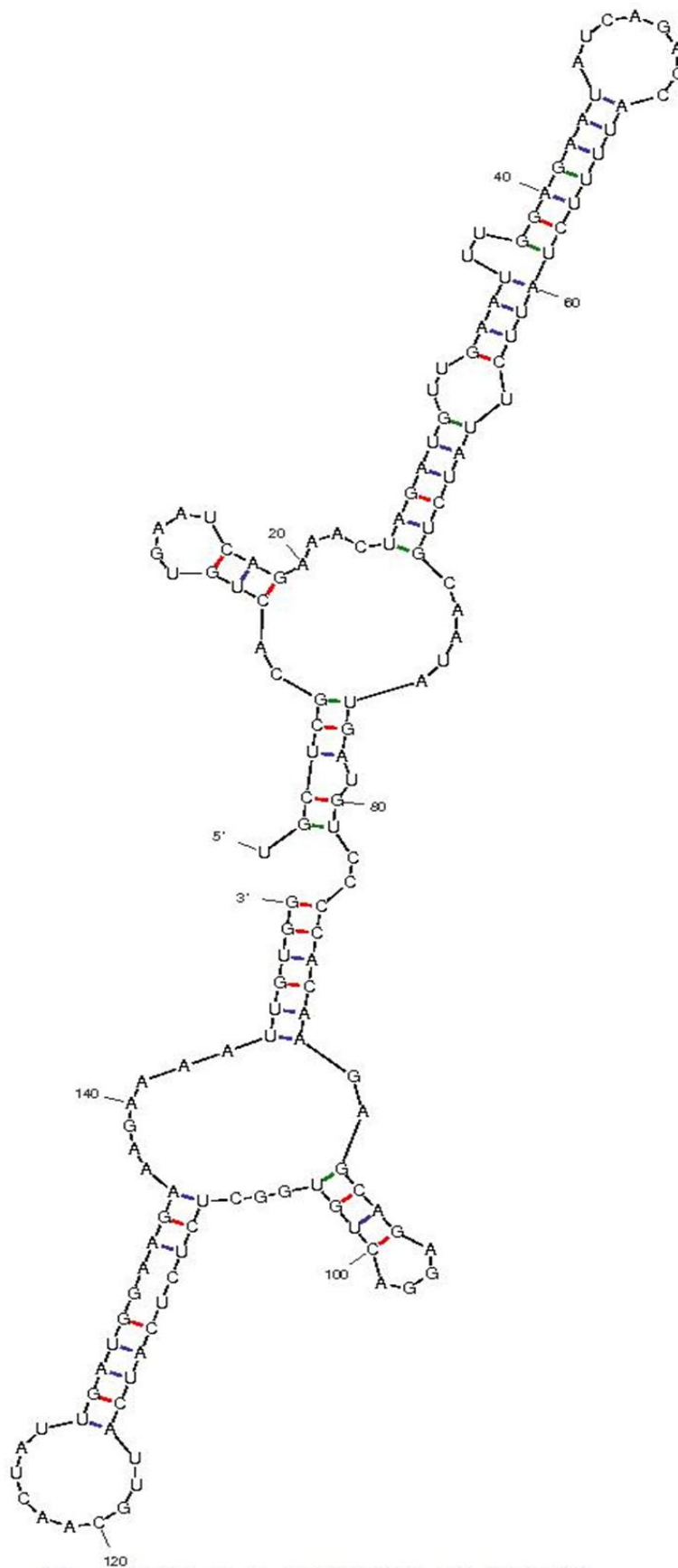


Figura 15 - Estrutura tridimensional do segmento genômico de 150 pb da região da Protease (Pro) do CPSMV.

No caso do CABMV, o fragmento genômico identificado como sendo o mais apropriado para utilização na construção do cassete de interferência foi um fragmento de 150 pb da região do gene da proteína de Inclusão Cilíndrica (CI), como representado abaixo.

```
CTACCTTTTTATGTTAATGGCATCCCAGACAAGCTCTTCGAAGCATTATGGGATACAGTCTCCA
AGTACCGCTATGATGCAGGTTTCGGTTCGAATAAGTTCAACGAGTTCACAAAGATCAGCTACAC
ACTCAGCACAGAGCCAACAGCC
```

A estrutura tridimensional do fragmento genômico indicada na figura 16 apresentou o maior valor de energia livre de Gibb's entre todos os segmentos genômicos de CABMV avaliados, $\Delta G = -27,00$ kcal/mol.

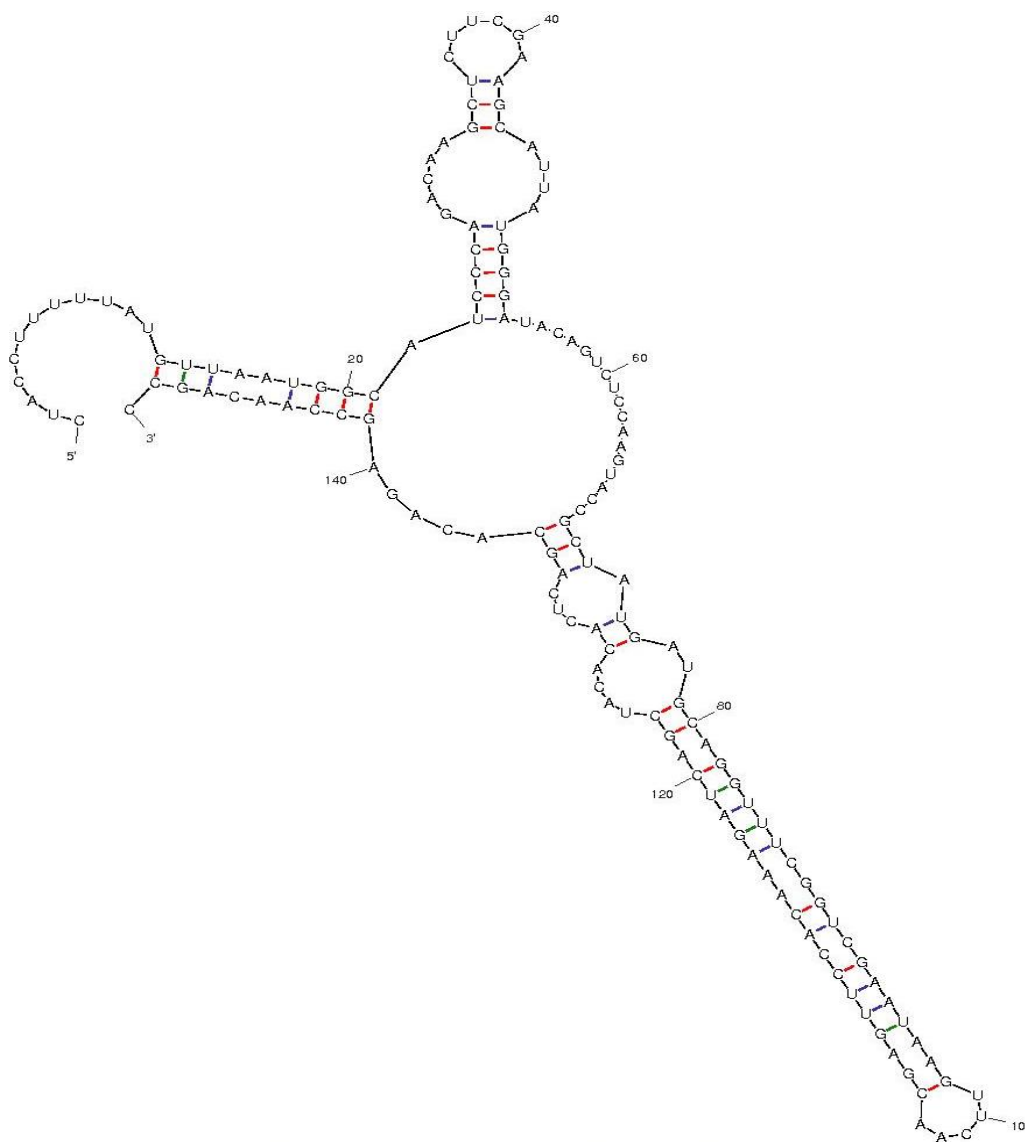


Figura 16 - Estrutura tridimensional do segmento genômico de 150 pb da região da Protease (Pro) do CPSMV.

3.2 Análise termodinâmica dos segmentos genômicos do CPSMV e CABMV para construção do cassete de interferência

Após a seleção dos segmentos genômicos do CPSMV e CABMV mais adequados para a utilização na construção do cassete de interferência. Realizou-se uma simulação *in silico* do cassete de interferência com os segmentos genômicos selecionados e dispostos em *Tandem* no sentido senso e antisenso contendo entre elas uma sequência de 20 pb do intro pdk, formando um cassete de 618 pb como segue abaixo. A análise termodinâmica revelou um $\Delta G = -591,00$ kcal/mol e apresentou a formação de um *hairpin*-dsRNA perfeito. Indicando que a reação é extremamente espontânea e favorável para a formação do *hairpin*-dsRNA. Portanto, podemos contatar que de todas as sequências analisadas a partir dos fragmentos genômicos de CPSMV e CABMV disponíveis as sequências mais adequadas estão proposta abaixo.

```
CTACCTTTTTATGTTAATGGCATCCCAGACAAGCTCTTCGAAGCATTATGGGATACAGTCTCCA
AGTACCGCTATGATGCAGGTTTCGGTCGAATAAGTTCAACGAGTTCCACAAAGATCAGCTACAC
ACTCAGCACAGAGCCAACAGCCTGCTCGCACTGTGAATCAGAACTAGATGTTGAATTTGGAGA
ATATCAGACCATTTTCTATTCTTATCTGCAATATGATGTCCCCACAAGAGCAGAGGACTGTGGC
TCTCTCATCATTGCAACTATTGATGGAAGAAAGAAAATTGTGGATAATTATTTTCTTTTTTCCC
CACAATTTTCTTTCTTCCATCAATAGTTGCAATGATGAGAGAGCCACAGTCCTCTGCTCTTGTG
GGGACATCATATTGCAGATAAGAATAGAAAATGGTCTGATATTCTCAAATTCACATCTAGTT
TCTGATTACAGTGCGAGCAGGCTGTTGGCTCTGTGCTGAGTGTGTAGCTGATCTTTGTGGAAC
TCGTTGAACTTATTCGACCGAAACCTGCATCATAGCGGTACTTGGAGACTGTATCCCATAATGC
TTCGAAGAGCTTGTCTGGGATGCCATTAACATAAAAAGGTAG
```



Figura 17 - Estrutura tridimensional do cassete de interferência contendo os segmentos genômicos de 150 pb do CPSMV e CABMV no sentido senso e antisenso e intro PDK.

4 REFERÊNCIAS

Zuker, M.; Mathews, D.H.; Turner, D. H. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski and B. F. C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999).

CAPÍTULO V

APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

Por muitas décadas os trabalhos de virologia vegetal consistiram na purificação química de vírus de plantas, na produção de anti-soros para utilização em diagnósticos, análises por microscopia eletrônica e determinação de características biológicas dos vírus. Os estudos de replicação, clonagem e sequenciamento dos genomas virais e estudos de interação entre patógeno e hospedeiro só foram iniciados em meados da década de 80, quando Ahlquist e colaboradores em 1984 obtiveram *in vitro*, pela primeira vez, RNAs infecciosos de um vírus de planta por meio da transcrição de DNA complementar (cDNA) clonado em *Escherichia coli*. Ao longo dessas últimas décadas, muitas informações foram geradas, permitindo estudos aprofundados das características genéticas e moleculares das mais variadas espécies ou estirpes de vírus de plantas. Informações a respeito da estrutura genética das populações de vírus, o modo de propagação, a biologia do vírus em relação a gama de hospedeiros e estudos epidemiológicos, foram aprofundados. Este arcabouço de informações têm contribuído enormemente para os programas de melhoramento das mais variadas culturas de importância socioeconômica.

Em se tratando do feijão-caupi, leguminosa de grande importância para o Nordeste brasileiro, os principais fatores limitantes para a expansão desta cultura são as doenças causadas por vírus. O CPSMV e CABMV ocasionam grandes perdas na produção de caupi levando à destruição total das plantas infectadas. Uma estratégia eficaz para o controle dessas viroses é o uso de variedades resistentes. No entanto, variedades que apresentam imunidade ou mesmo elevado nível de resistência a estas doenças não estão disponíveis comercialmente. Neste contexto, os resultados obtidos em nosso estudo serão de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias e/ou ferramentas que irão auxiliar ao melhoramento genético, como:

- i) A obtenção de plantas transgênicas utilizando a estratégia de interferência de RNA (RNAi), a partir de regiões conservadas alvos dos genomas dos vírus para o desenvolvimento de linhagens resistentes a uma amplo espectro de espécies e de isolados virais.
- ii) Possibilidade de desenvolvimento de variedades resistentes, utilizando informações da variabilidade genética associada às informações de agressividade dos diferentes isolados encontrados. Isto possibilita avaliar, durante o pré-melhoramento, acessos com níveis elevados de

tolerância aos diferentes isolados, influenciando diretamente os cruzamentos para a obtenção de plantas resistentes.

- iii)** Clonar e sequenciar regiões cada vez maiores de um grande número de isolados ou até mesmo espécies filogeneticamente próximas, possibilitando a disponibilização de sequências de regiões diferentes dos vírus estudados.
- iv)** Aprimorar os estudos taxonômicos e classificação das espécies de vírus filogeneticamente relacionadas, a partir das sequências obtidas de novas regiões comumente não disponibilizadas.
- v)** Ajudar a identificar e classificar novas espécies de vírus.
- vi)** Auxiliar nos estudos epidemiológicos, a partir de observações feitas sobre prevalência de sintomatologia encontrada no campo, em casos de infecções mista pelo CPSMV e CABMV.
- vii)** Por fim, encontrar genes ou domínios conservados mais adequados para o desenvolvimento de kits diagnósticos (sorológico ou moleculares) válidos para uma ampla gama de isolados a partir de informações da variabilidade genética de regiões adicionais do genoma dos isolados de CPSMV e CABMV, que não as comumente encontradas pela capa proteica.

Anexo



ARTIGO ACEITO NO PERIÓDICO GENETIC AND MOLECULAR RESEARCH

**DIVERSITY AMONG ISOLATES OF *COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS*
INFECTING COWPEA**

E. F. M. Abreu^{1,2}, M. L. P. Tinoco³, E. C. Andrade¹ and F. J. L. Aragão³

¹Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brazil.

²Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Brasília, DF, Brazil.

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil.

Corresponding author: F.J.L. Aragão

E-mail: aragao@cenargen.embrapa.br

Abstract

Isolates of *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), a member of the genus *Comovirus*, were collected from cowpea fields in Northeastern Brazil and partially sequenced. The RNA1 sequence, corresponding to the helicase (Hel), viral genome-linked protein (VPg), picornain 3C-like protease (Pro) and the RNA-directed RNA polymerase (RpRd) genes from CPSMV, revealed high identity varying from 98 to 100%. No evidence was found for either intermolecular or intramolecular recombination. Phylogenetic analysis confirmed that the Brazilian CPSMV isolates are substantially different from the CPSMV strain DG. Despite the low variability found among Brazilian CPSMV isolates, there was a notable difference in their symptomatology on infected cowpea plants, ranging from mild to moderate. Previous reports have demonstrated the association between *Comovirus* symptom determinants and helicase. However, in this study, no correlation was found between the helicase mutations and symptoms caused by

CPSMV. Nevertheless, all isolates with mutation R to K in the protease presented severe symptoms. This study provides information that will be the foundation for the development of strategies to produce durable resistant cowpea lines. It is even more crucial for strategies based on sequence-dependent technologies, such as the RNAi concept.

Introduction

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) is an annual tropical grain legume, which plays an important role in the nutrition of people in developing countries of the tropics and subtropics, especially in sub-Saharan Africa, Central Asia and South America (Kareem and Taiwo, 2007). Because of its nutritional properties, the cowpea is mainly grown for grain production, either being dried or canned green aiming at “in natura” consumption. It is an inexpensive source of vegetable protein, and a hardy crop well adapted to relatively dry environments. Pathogenic organisms are largely responsible for significant losses in cowpea plantations, often frustrating the crop in a number of regions. Among the problems of the cowpea plant, those of viral etiology stand out, and about 20 different viruses are reported worldwide infecting this crop naturally (Thottappily and Rossel, 1985). One of the most important viruses that infect cowpea in Brazil is *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), which belongs to the family *Secoviridae* and genus *Comovirus* (Gonçalves and Lima, 1982; Lima et al., 2005; Booker et al., 2005).

CPSMV consists of two molecules of single-stranded RNA, positive sense, called RNA1 and RNA2. The genomic RNAs have a small basic protein (viral genome-linked protein, VPg) covalently linked to their 5' termini and are polyadenylated at the 3' end (Chen X and Bruening G, 1992). The CPSMV genome is expressed via the synthesis and proteolytic processing of polyprotein precursor strategy. CPSMV RNA1 codes for five mature proteins required for replication (from 5' to 3', a protease cofactor [Co-pro], a putative helicase [Hel], a VPg, a protease [Pro], and a putative RNA-dependent RNA polymerase [RdRp]), whereas RNA2 codes for a putative cell-to-cell movement protein and the two coat proteins (Lomonossoff et al., 2001; Le Gall et al., 2005). CPSMV is easily transmitted mechanically, and in nature it is spread in a semi-persistent manner by

several Chrysomelidae beetles, among them *Ceratonia arcuata*, the most important vector in Brazil (Costa et al., 1978; Lima et al., 2005b).

An interesting alternative for the control of CPSMV is the use of resistant cultivars. An attractive strategy would be to use engineered transgenic plants exploring the RNA interference (RNAi) concept to silence viral genes (Bonfim et al., 2007). The use of inverted repeat constructs, resulting in dsRNA transcripts, is the most efficient means of generating transformed lines showing effective gene knockdown or virus resistance (Aragão and Faria, 2009). However, RNAi is a sequence-specific gene silencing mechanism. Consequently, information about virus genome variability is crucial. In spite of the numerous studies on viruses infecting cowpea, information on virus diversity and genome variability is still limited (Beserra Jr. et al., 2011). In this report, we partially sequenced isolates of the CPSMV occurring in the Northeast of Brazil, where cowpea is a staple food for about 68 million people and the cultivation area comprises 1.3 million ha.

Material and Methods

Virus isolates

Plants with different levels of CPSMV symptoms were collected in nine States of Brazil (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia and Distrito Federal). During collection, the leaf samples were placed immediately in plastic bags containing moistened paper, transported to the laboratory in a styrofoam box with ice packs, and stored at -80 °C until used. Geographic origins of the CPSMV isolates are shown in figure 1.

RNA extraction and RNA1 sequencing

Total RNA was extracted from infected tissue with Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and was afterwards used for synthesis of cDNA fragments by RT-PCR using the Superscript® III Reverse Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

RNA1 genomic segment from CPSMV was partially amplified by PCR using the primers CSMVF2000 (5'-GAGAAGGGAATGCACTTTGATT-3') and CSMVR4400 (5'-AGATTATATTCCATAGGAAGTA-3') and Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The amplified 2,200 nt fragment corresponded to the helicase (Hel), VPg and 3C-like protease (Pro) and partial sequence of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) coding sequence. PCR amplification was performed with an initial heating at 94 °C for 3 min followed by 40 cycles of denaturation (94 °C/1 min), annealing (50 °C/1 min) and extension (68 °C/4 min), followed by a final extension at 68 °C for 10 min. Amplified PCR products were directly sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The partial RNA1 sequences obtained were deposited in GenBank under accession no. JN652787 through JN652797.

RNA dot-blot

Total RNA was extracted from infected plants using the TRIzol RNA Purification Kit (Invitrogen). The RNA (50 µg) was resuspended in 1 mM EDTA pH 8.0 to a final volume of 50 µl. To this was added 30 ml 20X SSC and 20 ml 37 % formaldehyde. The samples were incubated for 30 min at 60 °C and kept on ice until transferred to a nylon membrane. Hybridization was carried out as previously described (Bonfim et al., 2007). The probe was obtained from the Taíba-CE CPSMV isolate cloned into the pGEMTEasy vector (Promega), digested with *EcoRI* and *HindIII* to generate a 362-bp fragment.

Sequence analyses

Nucleotides and amino acids sequences were aligned using the ClustalW program. Phylogenetic analysis was performed with Mega 5 (Tamura et al., 2011) using the Kimura 2 parameter model for estimating genetic distances. A phylogenetic tree was obtained using the maximum-likelihood algorithm with 1000 bootstrap replicates. This study compared individually the nucleotide and amino acid sequences with previously reported isolates of the same species or with isolates of the same genus (sequences retrieved from the GenBank) to determine the relationship between Brazilian CPSMV isolates.

Results and Discussion

Fifty samples were collected from cowpea commercial fields in nine Brazilian states (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia and Distrito Federal) (figure 1). All samples were screened for the presence of the CPSMV by RNA blot analysis. The results revealed that 50 % of the samples were positive (data not shown). Eleven isolates were chosen for sequencing based on the symptoms and cultivated area in each region (figure 1). A 2,200 nt sequence was produced, corresponding to the helicase (Hel), viral genome-linked protein (VPg), picornain 3C-like protease (Pro) and the RNA-directed RNA polymerase (RpRd) genes from CPSMV. Sequencing of RNA1 RT-PCR products from total RNA extracted revealed high identity varying from 98 to 100% (table 1). The sample from the isolate from Brazlândia-DF revealed 100% identity when compared with the isolate from Taíba-CE, sites which are 1,800 km apart. The amino acid identity was also high, varying from 96 to 100%. Similar results were observed for isolates of the *Bean pod mottle virus* (BPMV) infecting *Desmodium illinoense* in the USA. Nucleic acid identity of 99.4 to 100% was observed, with a predicted amino acid similarity varying from 98.5 to 99.4% in a fragment from RNA1 (Bradshaw et al., 2011). In addition, a recent study determined that the variability in 521 nt from the coat protein gene of six isolates collected over a period of 32 years from CPSMV was also very low, ranging from 97 to 100% nucleic acid identity and from 92 to 100% in the predicted amino acid sequences (Beserra Jr. et al., 2011).

Zhang et al. (2007) observed the presence of chimeric and mosaic RNA1 recombinants in the *Comovirus* BPMV infecting soybean. In this work we found no evidence for either intermolecular or intramolecular recombination in the RNA1 from CPSMV. Considering the fact that we analyzed isolates collected in distinct places distributed over an area of 1.2 million square kilometers, it seems that the variability observed in CPSMV in Brazil is low, which encourages us to use strategies based on RNAi for obtaining transgenic plants resistant to CPSMV that could be used throughout the extensive area where cowpea is grown in Brazil.

Phylogenetic analysis confirmed that the Brazilian CPSMV isolates are substantially different from CPSMV strain DG (figure 2). The robustness of the resulting phylogeny

was evaluated by bootstrap analysis. An additional analysis with the partial RNA-1 encoded polyprotein revealed a clear separation between isolates from Taíba-CE, Irecê-BA and Terezina-PI, which rooted forming a clade separated from the other Brazilian isolates. Nevertheless, no biological contrasts could be associated with this separation.

Despite the low variability found among Brazilian CPSMV isolates, there is a notable difference in their symptomatology on infected cowpea plants, ranging from mild to moderate. To determine host responses to the CPSMV isolates, symptoms in infected cowpea plants were compared using a scale from + (mild) to ++++ (severe). For BPMV, symptom determinants have been associated with the protease cofactor (Co-pro) and helicase from BPMV RNA1 (Gu and Ghabrial, 2005). However, in this study, no correlation was found between mutations in the helicase and symptoms caused by the CPSMV, but all isolates with mutation R to K in the protease presented severe symptoms (figure 3). Complete sequences from the virus genome should be further analyzed in order to make a better association between amino acids/protein structure variation and symptoms.

Results of the present study enhance observations regarding naturally occurring genetic diversity among CPSMV isolates, which is important for the biology of the virus population and provides a basis for understanding the difficulty in identifying host resistance for disease control. In addition, this study provides information that will be the foundation for the development of strategies to produce durable resistant lines. It is even more crucial for strategies based on sequence-dependent technologies, such as the RNAi concept. Experiments are ongoing to generate transgenic cowpea plants that are resistant to CPSMV.

Acknowledgments

We thank Joaquim A. A. de Oliveira for help to collect cowpea samples. E.F.M.A. was supported by a fellowship from CNPq.

References

Aragão FJL and Faria JC. (2009). First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nature Biotechnology* 27: 1086 – 1088.

Beserra Jr JEA, Andrade EC, Camarço RFRA, Nascimento AKQ, Lima JAA. (2011). Sequence variability in the coat protein gene of *Cowpea severe mosaic virus* isolates from northeastern Brazil. *Tropical Plant pathology* 36(2): 121-124.

Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, et al. (2007). RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant-Microbe Interact* 20(6): 717–726.

Bradshaw JD, Zhang C, Hill JH, Rice ME. (2011). Landscape epidemiology of *Bean pod mottle* comovirus: molecular evidence of heterogeneous sources. *Arch Virol* 156:1615–1619.

Booker HM, Umaharan P, McDavid CR. (2005). Effect of Cowpea severe mosaic virus on growth characteristics and yield of cowpea. *Plant Disease* 89:515-520.

Chen X and Bruening G. (1992). Cloned copies of *Cowpea severe mosaic virus* RNAs: infectious transcripts and complete nucleotide sequence of RNA 1. *Virology* 191:607-618.

Costa CL, Lin MT, Kitajima EW, et al. (1978). *Cerotoma arcuata* (Oliv.) a chrysomelid vector *Vigna* mosaic in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 3: 81-82.

Gonçalves MFB and Lima JAA. (1982). Efeitos do *Cowpea severe mosaic virus* sobre a produtividade do feijão-de-corda. *Fitopatologia Brasileira* 7:547.

Gu H and Ghabrial SA. (2005). The *Bean pod mottle virus* proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants. *Virology* 333(2): 271-83.

Kareem KT and Taiwo MA. (2007). Interactions of viruses in Cowpea: Effects on growth and yield parameters. *Virology J* 4: 15.

Le Gall O, Iwanami T, Karasev AV, et al. (2005). Family *Comoviridae*. In: *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA, eds). 807–818.

Lima JAA, Nascimento AK, Silva GS, et al. (2005b). *Crotalaria paulinea* new natural host of the *Cowpea severe mosaic virus*. *Fitopatologia Brasileira* 30(4): 429-433.

Lima JAA, Sittolin IM, Lima RCA. (2005). Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: Freire Filho FR, Lima JAA, Ribeiro VQ (Eds.) *Feijão-Caupi Avanços Tecnológicos*. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília DF. pp. 403-459.

Lomonossoff GP and Ghabrial SA. (2001). Comoviruses. In: *Encyclopedia of Plant Pathology* (Maloy OC and Murray TD, eds) John Wiley and Sons, New York. Vol. 1, 239- 242.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol* 4: 1-9.

Thottappily G and Rossel HW. (1985). Worldwide occurrence and distribution of virus diseases. In: Cowpea research, production and utilization. (Singh SR, Richaie KO, eds.) Chichester: Jonh Wiley & Sons. 155-171.

Zhang C, Gu H, Ghabrial SA. (2007). Molecular characterization of naturally occurring RNA1 recombinants of the Comovirus *Bean pod mottle virus*. *Phytopathology* 97: 1255–1262.

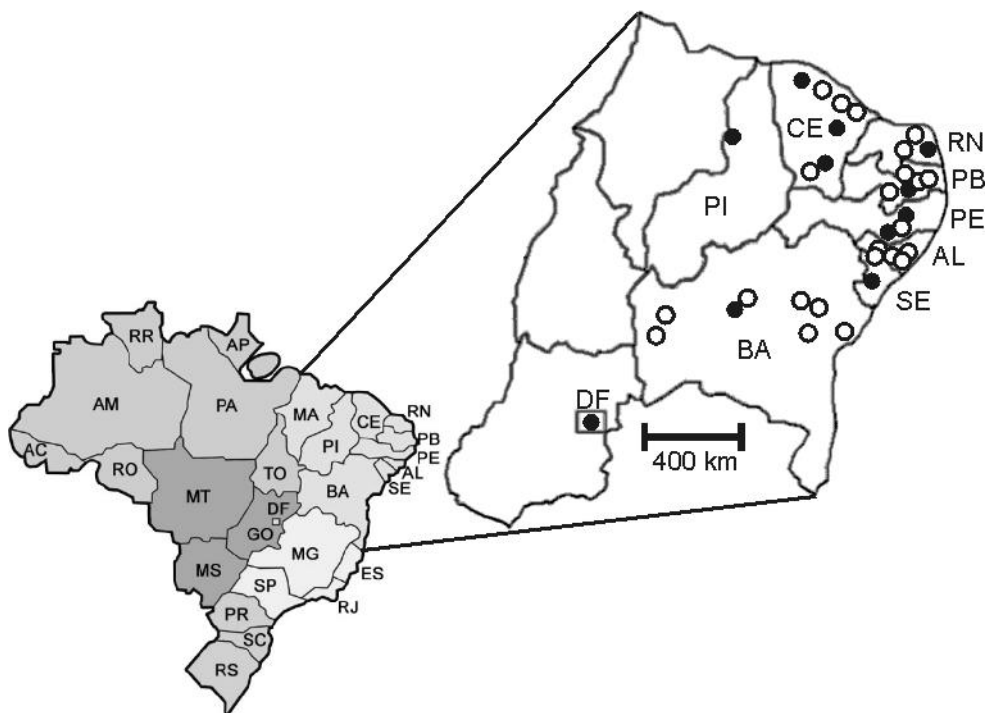


Figure 1. Map indicating municipalities where samples were collected (open circles) and those that were sequenced (solid circles).

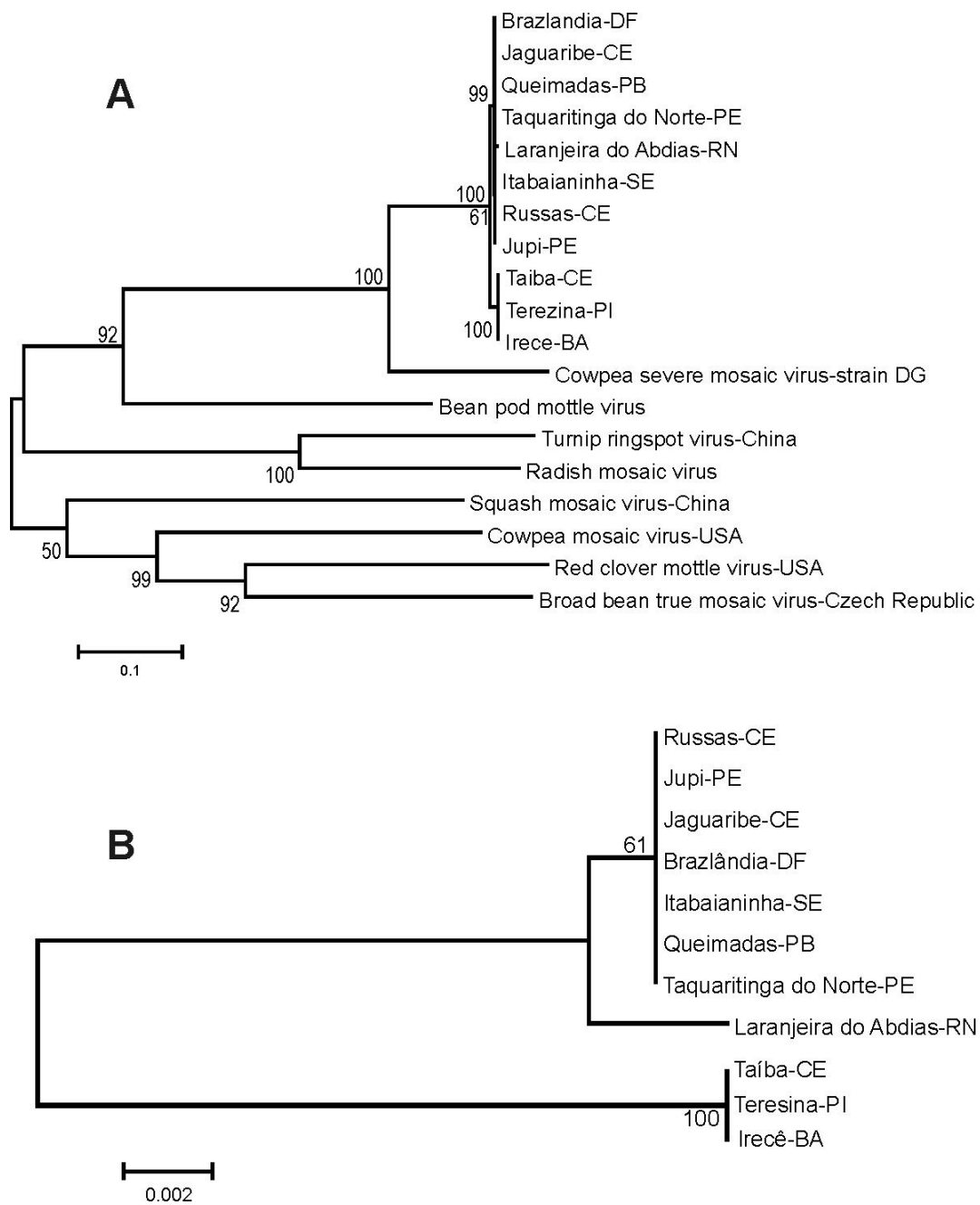


Figure 2. Maximum-likelihood tree of *Cowpea severe mosaic virus* isolates and species from *Comovirus* genus based on 2,200 nt from RNA1 (A). Correspondent sequences from *Comovirus* species were retrieved from GenBank accessions X00206 (*Cowpea mosaic virus*), AY744932 (*Bean pod mottle virus*), GU968732 (*Turnip ringspot virus*) X64886 (*Red clover mottle virus*), EU450837 (*Radish mosaic virus*), GU810903 (*Broad bean true mosaic virus*), M83830 (*Cowpea severe mosaic virus*) and EU421059 (*Squash mosaic virus*). Bootstrap values are of 1000 replicates and are expressed at nodes. In (B) there is a bootstrap consensus phylogenetic tree of the partial RNA1-encoded polyprotein from 11 Brazilian CPSMV isolates .

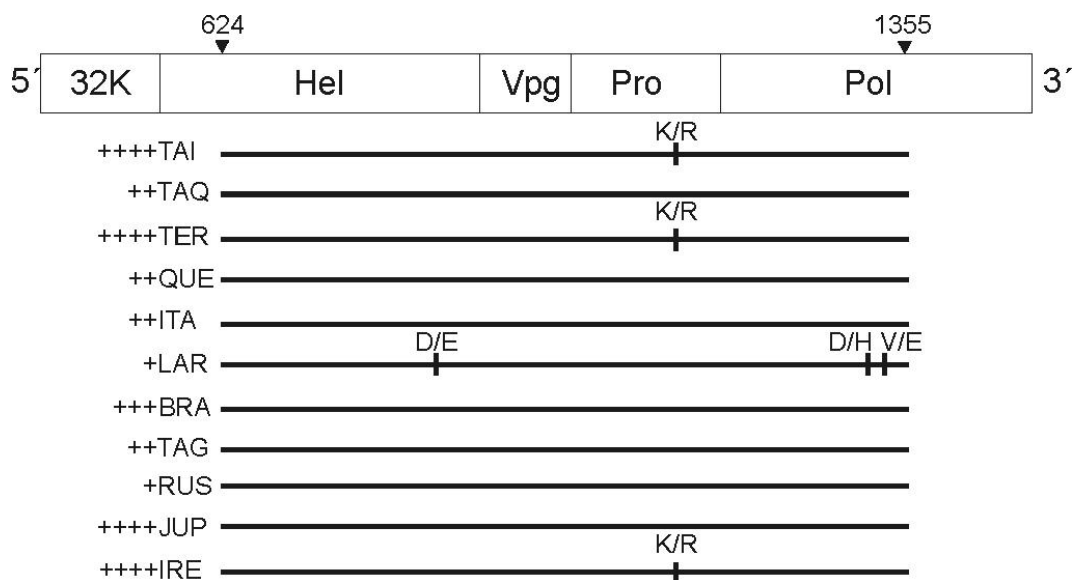


Figure 3 Distribution of divergence as compared to the consensus sequence of cowpea field isolates for the partial RNA1-encoded polyprotein from *Cowpea severe mosaic virus* corresponding to helicase (Hel), viral genome-linked protein (VPg), picornain 3C-like protease (Pro) and RNA-directed RNA polymerase (RdRp) (amino acid 624 to

1355). A diagram of CPSMV RNA1 genome organization is shown at the top. Vertical lines indicate amino acid substitutions and symptom severity provoked by infection, with each isolate scored by + (mild) to ++++ (severe). Isolates are designed by: TAI: Taíba-CE; TAQ: 2: Taquaritinga do Norte-PE; TER: Teresina-PI; QUE: Queimadas-PB; ITA: Itabaianinha-SE; LAR: Laranjeira do Abdias-RN; BRA: Brazlândia-DF; TAG: Jaguaribe-CE; RUS: Russas-CE; JUP: Jupi-PE; IRE: Irecê-BA.

Table 1. Percent nucleotide (above diagonal) and deduced amino acid (below diagonal) sequence identity of a fragment from RNA1 (2,200 nt) of 11 Brazilian CPSMV isolates.

	TAI	TAQ	TER	QUE	ITA	LAR	BRA	JAG	RUS	JUP	IRE
TAI		98	100	98	98	98	98	98	98	98	98
TAQ	97		98	100	99	99	100	100	99	99	99
TER	100	97		98	98	98	98	98	98	98	98
QUE	97	100	97		99	99	100	99	99	99	99
ITA	97	100	97	100		99	99	99	100	100	100
LAR	97	99	96	99	99		99	99	99	99	99
BRA	97	100	97	100	100	99		100	99	99	99
JAG	97	100	97	100	100	99	100		99	99	99
RUS	97	100	97	100	100	99	100	100		100	100
JUP	97	100	97	100	100	99	100	100	100		99
IRE	97	100	97	100	100	99	99	99	100	100	

TAI: Taíba-CE; TAQ: 2: Taquaritinga do Norte-PE; TER: Terezina-PI; QUE: Queimadas-PB; ITA: Itabaianinha-SE; LAR: Laranjeira do Abdias-RN; BRA: Brazlândia-DF; TAG: Jaguaribe-CE; RUS: Russas-CE; JUP: Jupi-PE; IRE: Irecê-BA.

