

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E OCORRÊNCIA DE *Bidens mosaic virus* (BiMV)
EM REGIÕES PRODUTORAS DE ALFACE NO ESTADO DE SÃO
PAULO**

MÁRCIO MARTINELLO SANCHES

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Dezembro - 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E OCORRÊNCIA DE *Bidens mosaic virus* (BiMV)
EM REGIÕES PRODUTORAS DE ALFACE NO ESTADO DE SÃO
PAULO**

MÁRCIO MARTINELLO SANCHES

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renate Krause Sakate

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Dezembro – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S211c Sanches, Márcio Martinello, 1980-
Caracterização e ocorrência de *Bidens mosaic virus* (BiMV) em regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo / Márcio Martinello Sanches. - Botucatu, [s.n.], 2009. xi, 107 f. : il., color., gráfs, tabs.

Tese(Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009

Orientador: Renate Krause Sakate
Co-orientador: Marcelo Agenor Pavan
Inclui bibliografia

1. Potyvirus. 2. BiMV. 3. PVY. 4. *Galinsoga parviflora*. 5. *Bidens pilosa*. 6. *Lactuca sativa*. I. Sakate, Renate Krause. II. Pavan, Marcelo Agenor. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

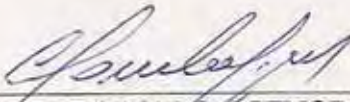
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO E OCORRÊNCIA DE *Bidens mosaic virus* (BiMV)
EM REGIÕES PRODUTORAS DE ALFACE NO ESTADO DE SÃO PAULO"

ALUNO: MARCIO MARTINELLO SANCHES

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

Aprovado pela Comissão Examinadora




PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



PROF. DR. NORBERTO DA SILVA



PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. VALDIR ATSUSHI YUKI



PROF. DR. ROMULO FUJITO KOBORI

Data da Realização: 15 de dezembro 2009.

*“Ó Mestre, fazei que eu procure mais
consolar que ser consolado;
compreender que ser compreendido,
amar, que ser amado.
Pois é dando que se recebe
é perdoando que se é perdoado...”*

São Francisco de Assis

Ofereço

À minha esposa Elaine Cristina,
Ao meu filho Gabriel Henrique

Dedico

Ao meu pai Roberto (*in memoriam*)
À minha avó Aparecida (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo o que tem oferecido em minha vida.

À minha esposa Elaine Cristina e ao meu filho Gabriel Henrique, pela paciência, pelo apoio, incentivo e carinho.

À minha família: minha mãe Ana Maria, meus irmãos Alexandre e Roberta, meus sogros Clementino e Maria Helena e meus cunhados Cristiano e Liliane pelo carinho e incentivo para realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Renate Krause Sakate, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela paciência e compreensão, incentivo e competência na condução dos trabalhos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan pelas sugestões, contribuições e informações valiosas para o desenvolvimento do trabalho.

Aos companheiros de laboratório Márcia César, Denise Nozaki, Gerson Suzuki, Kelly Cristina, Mônica Fecury e Tatiana Mituti por todo apoio, ensinamentos e amizade.

Ao Júlio Marubayashi por todo apoio que me ofereceu em Botucatu e principalmente pela amizade.

Aos alunos de iniciação científica David M. de Almeida Spadotti e Bruno Rossito De Marchi pela ajuda fundamental nos trabalhos de laboratório e de campo e pela amizade.

Aos colegas de curso Marta, Sandra, Alexandre, Caroline e todos aqueles com que convivi, pela amizade e ajuda nos momentos difíceis.

Aos Professores Antonio Carlos Maringoni, Silvia Renata S. Wilcken, Luiz Carlos Luchini, Hélio Grassi Filho, João Domingos Rodrigues pela formação e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal e da Faculdade de Ciências Agronômicas, especialmente o Paulinho e a Fátima pelos auxílios com os experimentos e pela amizade.

À Prefeitura Municipal de Lençóis Paulista pelo apoio para a realização do Doutorado.

Aos funcionários da CETESB pelo estímulo e incentivo profissional.

E a todos que de alguma maneira contribuíram na realização deste projeto.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| Lista de Figuras..... | VIII |
| Lista de Tabelas..... | X |
| 1. Resumo..... | 1 |
| 2. Summary..... | 3 |
| 3. Introdução..... | 5 |
| 4. Revisão de Literatura..... | 7 |
| 4.1. Família <i>Potyviridae</i> | 7 |
| 4.2. Principais vírus que infectam alface..... | 13 |
| 4.2.1. <i>Lettuce mosaic virus</i> – LMV..... | 13 |
| 4.2.2. Vírus do complexo vira-cabeça..... | 14 |
| 4.2.3 Engrossamento das nervuras ou “big vein”..... | 15 |
| 4.2.4. Lettuce mottle virus (LeMoV)..... | 16 |
| 4.2.5. Bidens mosaic virus..... | 17 |
| 4.2.5.1. Transmissão e sintomatologia..... | 17 |
| 4.2.5.2. Propriedades e características do vírus..... | 20 |
| 5. Material e Métodos..... | 24 |
| 5.1. Manutenção dos isolados virais..... | 24 |
| 5.2. Caracterização biológica dos isolados..... | 24 |
| 5.3. Caracterização molecular do isolado BiMV-13..... | 25 |
| 5.3.1. Minipurificação viral seguido de extração de RNA total..... | 25 |
| 5.3.2. Reação de Transcrição Reversa (RT)..... | 26 |
| 5.3.3. Reação de PCR..... | 26 |
| 5.4. Caracterização molecular do isolado BiMV-SP..... | 28 |
| 5.4.1. Extração do RNA..... | 28 |
| 5.4.2. Reação de Transcrição Reversa (RT) e PCR..... | 29 |
| 5.4.3. Amplificação da região 5’ terminal..... | 30 |
| 5.4.3.1 Síntese de cDNA | 31 |

| | |
|--|----|
| 5.4.3.2 RACE PCR..... | 31 |
| 5.5. Levantamento da ocorrência de BiMV em três regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo..... | 33 |
| 5.6. Transcrição reversa e reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR)..... | 36 |
| 5.7. Preparo de Células Competentes de <i>Escherichia coli</i> | 37 |
| 5.8. Clonagem e seqüenciamento..... | 38 |
| 5.9. Purificação do BiMV para imunização de coelhos..... | 40 |
| 5.9.1. Espectrofotometria..... | 41 |
| 5.9.2. Teste de infectividade..... | 41 |
| 5.9.3 Microscopia Eletrônica..... | 41 |
| 5.10. Gel de Poliacrilamida para estimativa do Peso Molecular da Proteína Capsidial..... | 42 |
| 5.11. Obtenção do Anti-soro..... | 43 |
| 5.12. PTA-ELISA..... | 43 |
| 6. Resultados e Discussão..... | 45 |
| 6.1. Caracterização biológica dos isolados..... | 45 |
| 6.2. Avaliação de cultivares comerciais de alface..... | 49 |
| 6.3. Caracterização molecular do isolado BiMV-13 e BiMV-SP..... | 50 |
| 6.4. Purificação do isolado BiMV-13 | 60 |
| 6.5. Obtenção do anti-soro e PTA-ELISA..... | 62 |
| 6.6. Estimativa do Peso molecular da proteína capsidial..... | 65 |
| 6.7. Obtenção de oligonucleotídeos específicos..... | 65 |
| 6.8. Levantamento da ocorrência de BiMV nas regiões produtoras de alface..... | 66 |
| 7. Conclusões..... | 72 |
| 8. Referências Bibliográficas..... | 73 |
| 9. Apêndice..... | 82 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| 1. Organização genômica do vírus <i>Tobacco etch virus</i> (TEV), gênero <i>Potyvirus</i> . A linha escura representa o RNA senso positivo e os retângulos coloridos representam as ORF. Os símbolos acima das ORF representam os sítios de clivagem das proteases (retirado de Berger et al., 2005)..... | 9 |
| 2. Posição relativa dos oligonucleotídeos desenhados em relação ao genoma do PVY-SN e estratégia para amplificar e sequenciar o genoma parcial do isolado de BiMV-13..... | 28 |
| 3. Posição relativa dos oligonucleotídeos desenhados em relação ao genoma do PVY-SN e estratégia para amplificar e sequenciar o genoma parcial do isolado de BiMV-SP..... | 33 |
| 4. Oligonucleotídeos específicos para diagnóstico de BiMV e sua posição relativa no genoma do PVY-SN..... | 37 |
| 5. Sintomas causados pelos isolados BiMV-13 em <i>Chenopodium quinoa</i> (A) e <i>Chenopodium amaranticolor</i> (B) e BiMV-SP em <i>C. quinoa</i> (C)..... | 47 |
| 6. Sintomas causados pelos isolados BiMV-13 (A) e BiMV-SP (B) em alface cv. Trocadero..... | 47 |
| 7. Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos 8851/9211, nas hospedeiras inoculadas com o isolado BiMV-SP. M=Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen). 1 e 2 – <i>N. tabacum</i> “Xanthi”, 3 a 5 – <i>G. globosa</i> , 6 e 7 – <i>D. metel</i> , 8 –Girassol catissol 1, 9 a 11 – alface “Trocadero”, 12 e 13 – <i>N. tabacum</i> “Turkish”, 14 a 15 – <i>N. tabacum</i> “TNN”. 16- controle negativo, 17 – controle positivo..... | 48 |
| 8. Sintomas causados pelo isolado BiMV-SP em <i>N. benthamiana</i> (A), girassol (B), <i>Z. elegans</i> (C), <i>N. clevelandii</i> (D) e <i>N. occidentalis</i> (E)..... | 49 |
| 9. Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos 7587sens/7885ant(1), 7587sens/8333ant(2), 4198sens/8333ant(3), 4198sens/7885ant(4), 8331sens/PolyT(5), 7821sens/8333ant(6). M = Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen)..... | 51 |
| 10. Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos 7958sens/8439ant (7 e 8), 8331sens/9046ant (9 e 10), PolyT/WCIEN (11 e 12) 1948/4290 (13 e 15) e 2134/4290(14 e 16). M = Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen)..... | 51 |

| | |
|--|----|
| 11. Árvore filogenética da seqüência de aminoácidos correspondente a região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados de BiMV e espécies de potyvirus, obtida pelo Programa Mega versão 3.1, utilizando Neighbor-Joining e valor de Bootstrap 2000..... | 55 |
| 12. Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos HPFor/HPRev(A) e CIFor/CIRRev(B). 1 a 4 cDNA proveniente de <i>C. quinoa</i> infectada. M = Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen)..... | 56 |
| 13. Padrão eletroforético obtido pela restrição enzimática do vetor pGEM-T com a enzima <i>EcoR</i> I. Ligação com o produto obtido pelos oligonucleotídeos 4198sens/8333ant. Clone de numero 14 contém o fragmento viral..... | 57 |
| 14. Padrão eletroforético obtido pela restrição enzimática do vetor pGEM-T com a enzima <i>EcoR</i> I. Ligação do vetor com o produto obtido pelos oligonucleotídeos 1948sens/4290ant (1 a 8) e 2134sens/4290ant (9 a 14). Clones 9 a 14 possuem o perfil eletroforético correto para presença do genoma viral..... | 57 |
| 15. Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos RACEBiMV1(1) e RACEBiMV2(2) e a partir do RNA controle do kit SMART RACE, amplificado pelo oligonucleotídeo 5' Race TFR (3 e 4) M = Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen)..... | 59 |
| 16. Banda viral resultante após o gradiente isopícnico de cloreto de céσιο..... | 60 |
| 17. Eletrofotomicrografia de partículas de BiMV após o processo de diálise. Aumento de 23.000 (A) e 77.500 (B) vezes..... | 61 |
| 18. Espectro de absorbância em luz ultravioleta do isolado BiMV-13 purificado..... | 62 |
| 19. Padrão de proteínas observado em gel de poliacrilamida. M: Marcador de Proteína BenchMarckTM Pré-Stained Protein Ladder (Invitrogen); 1: Purificado viral A: possível proteína capsidial..... | 65 |
| 20. Eletroforese em gel de agarose a 0,9% dos produtos de RT-PCR amplificados pelos oligonucleotídeos BiMV 8851 e BiMV 9211. (1) Marcador 1KB; (2) Alface infectada com BiMV; (3) <i>Bidens pilosa</i> infectada com BiMV; (4) Alface sadia; (5) <i>Bidens pilosa</i> sadio; (6) <i>Galinsoga parviflora</i> infectada com BiMV; (7) Alface controle positivo; (8) Controle negativo..... | 66 |
| 21. <i>Galinsoga parviflora</i> (fazendeiro) (A) coletado na região de Campinas com sintomas de mosaico e <i>Bidens pilosa</i> (picão preto) com sintoma de mosaico junto a plantio de alface na região de Campinas (B), ambos infectados por BiMV..... | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| 1. Dipeptídios existentes nos sítios de clivagem de espécies do gênero <i>Potyvirus</i> , de acordo com as proteínas virais clivadas e proteases específicas (Adaptado de Adams & Antoniw, 2009)..... | 11 |
| 2. Espécies hospedeiras e ocorrência de sintomas induzidos por isolados de BiMV estudados por diferentes autores..... | 18 |
| 3. Oligonucleotídeos desenhados para amplificação do genoma do BiMV-13..... | 27 |
| 4. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do genoma do BiMV-SP..... | 32 |
| 5. Número de plantas coletadas, propriedade, município, época de coleta e o hospedeiro analisado..... | 34 |
| 6. Lista de isolados de potyvirus utilizados para análise filogenética. A origem geográfica e número de acesso no GenBank do gene codificador para a proteína capsidial estão indicados..... | 40 |
| 7. Avaliação da gama de hospedeiros do isolado BiMV-13 e BiMV-SP..... | 46 |
| 8. Avaliação das principais cultivares de alface inoculadas com o isolado BiMV-13.. | 50 |
| 9. Porcentagens de identidade de nucleotídeos (inferior) e aminoácidos (superior) na região codificadora para a proteína capsidial entre isolados de BiMV e Potyvirus relacionados obtida pelo Programa Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html)..... | 53 |
| 10. Comparação da porcentagem de identidade de nucleotídeos dos genes sequenciados para o isolado BiMV-SP em comparação com os genes dos isolados PVY-SN e PVY –LYE84.2 e com a identidade proposta (inferior a este valor) para demarcação de espécies na família <i>Potyviridae</i> | 58 |
| 11. Dados de absorvância (medidos a 405 nm) para as diferentes diluições do extrato vegetal e do anti-soro..... | 63 |
| 12. Número de amostras de alface coletadas no outono de 2008, infectadas com BiMV através do teste de ELISA..... | 64 |

- 13.** Detecção através de RT-PCR dos vírus BiMV, LMV e LeMoV em plantas de alface sintomáticas em diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo nos anos de 2008 e 2009..... 67
- 14.** Detecção através de RT-PCR dos vírus BiMV, LMV e LeMoV em outras culturas ou plantas daninhas sintomáticas em diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo nos anos de 2008 e 2009..... 69

1. RESUMO

O Bidens mosaic virus (BiMV) é uma espécie tentativa de vírus do gênero *Potyvirus* e tem sido encontrado em culturas de importância econômica como ervilha e girassol. Recentemente foi proposto que o BiMV poderia ser uma estirpe do *Potato virus Y* (PVY). Em 2004 amostras de alface apresentando mosaico intenso, coletadas no município de São Manuel - SP, apresentavam-se infectadas pelo BiMV. Foi realizada a caracterização biológica, o sequenciamento parcial e a purificação deste isolado para obtenção de anti-soro policlonal. Verificou-se que este isolado possui gama de hospedeiros restrita à alface, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* e ervilha (*Pisum sativum*) de forma assintomática. O vírus possui uma proteína capsidial em torno de 33 kDa e padronizou-se um teste de PTA-ELISA para o diagnóstico sorológico deste vírus. Também foi realizada a caracterização biológica e avanços no sequenciamento do genoma de um isolado de BiMV coletado a partir da planta de *Bidens pilosa* (picão preto). Este isolado foi capaz de infectar e causar sintomas em girassol (*Helianthus annuus*), alface (*Lactuca sativa*), ervilha (*Pisum sativum*), *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *Zinnia elegans* e em *Gomphrena globosa*, nesta última de forma assintomática. Através do sequenciamento de um fragmento de 7.945 bp, correspondente à parte do gene da HC-Pro e dos genes da P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb, CP e à região 3'UTR, verificou-se que o BiMV é possivelmente uma espécie distinta do PVY, baseando-se nos atuais critérios para demarcação de espécies do International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Foram obtidos oligonucleotídeos específicos para diagnose do BiMV, que através de RT-PCR em uma só etapa, detectam eficientemente o vírus a partir de alface e de plantas daninhas associadas à cultura. Através

desta técnica foram analisadas um total de 222 amostras de alface e 126 amostras de outras culturas e plantas daninhas provenientes das regiões de Bauru, Campinas e Mogi das Cruzes. O vírus tem uma incidência baixa em alface, podendo ser considerado uma doença secundária nesta cultura. Em todas as propriedades com alface infectada havia também a ocorrência de picão preto ou fazendeiro (*Galinsoga parviflora*) infectados com o vírus, sendo esta última espécie vegetal identificada como hospedeira de BiMV e de Lettuce mottle virus (LeMoV) neste trabalho.

Palavras-chave: *Potyvirus*, BiMV, PVY, *Galinsoga parviflora*, *Bidens pilosa*, *Lactuca sativa*

CHARACTERIZATION AND OCCURENCE OF *Bidens* mosaic virus (BiMV) IN LETTUCE PRODUCING AREAS IN SÃO PAULO STATE. Botucatu, 2009. 107p.

Thesis (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MÁRCIO MARTINELLO SANCHES

Adviser: RENATE KRAUSE-SAKATE

Co-adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

2. SUMMARY

Bidens mosaic virus (BiMV) is a tentative species of the genus *Potyvirus*, and has been commonly found infecting pea and sunflower. Recently it was proposed that BiMV could be a member of the *Potato virus Y* (PVY) species. In 2004 lettuce plants showing intense mosaic symptoms were collected in São Manuel-SP and were infected with BiMV. The host range of this isolate was characterized, the genome partially sequenced and the virus was purified to obtain a polyclonal antiserum. The host range for this isolate was restricted to lettuce, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* and pea (*Pisum sativum*) (asymptomatic). The virus has a coat protein with approximately 33 kDa and the antiserum could be used for serological diagnosis by PTA-ELISA tests. A BiMV isolate from *Bidens pilosa* was also studied in this work. This isolate infected sunflower (*Helianthus annuus*), lettuce (*Lactuca sativa*), pea (*Pisum sativum*), *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *Zinnia elegans* and *Gomphrena globosa* (asymptomatic). A fragment of 7.945bp including part of the HC-Pro, the entire genes for P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, Nib, CP and the 3'UTR region was sequenced. Based on the International Committee on

Taxonomy of Viruses (ICTV) criteria of potyvirus species demarcation using the individual genes, BiMV could be considered a distinct species of PVY. Specific primers were obtained for BiMV diagnosis and efficiently used in a one step RT-PCR test for BiMV diagnoses. A total of 222 lettuce and 126 weeds samples were collected in the lettuce growing areas of Mogi das Cruzes, Campinas and Bauru and analysed by RT-PCR. Low incidence of BiMV was verified on lettuce. The presence of BiMV was also observed on *B. pilosa* and *Galinsoga parviflora*. This last plant species was identified as a new host of BiMV and Lettuce mottle virus (LeMoV) in this study.

Keywords: *Potyvirus*, BiMV, PVY, *Galinsoga parviflora*, *Bidens pilosa*, *Lactuca sativa*

3. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é originária da região do Mediterrâneo, onde sua utilização é relatada desde 4.500 a.C., como planta medicinal. Como hortaliça, é registrada desde 2.500 a.C. e foi trazida ao Brasil pelos portugueses (GOTO, 1998). Pertence à ordem Asterales, família Asteraceae. Esta família compreende cerca de 1.100 gêneros, com aproximadamente 25.000 espécies de ampla distribuição geográfica (HEYWOOD & HARBONE, 1977).

No Brasil, a família Asteraceae é representada pelos gêneros *Hypochoeris*, *Hicracium*, *Sonchus*, *Picris*, *Picrosia*, *Tragopogon*, *Taraxacum*, que não são cultivadas e os gêneros *Cichorium* e *Lactuca* com espécies cultivadas (BARROSO, 1986).

A alface originou-se de espécies silvestres, em regiões de clima temperado, no sul da Europa e Ásia Ocidental. Há diversos tipos de cultivares de alface que foram desenvolvidos através de seleção artificial, entre os quais, americana, crespa, lisa, mimosa e romana (FILGUEIRA, 2000).

É uma planta herbácea, com um caule diminuto ao qual se prendem as folhas que são a parte comestível da planta. A coloração das plantas pode variar do verde-amarelado até o verde escuro e também pode ser roxa, dependendo da cultivar (TRANI et al., 2005). A alface é a hortaliça folhosa de maior importância no Brasil. Até meados da década de 80, o mercado consumidor deu preferência ao segmento de alface lisa, quando houve uma mudança do segmento de alface lisa para a crespa, que corresponde atualmente a 70% do mercado nacional. O segmento do tipo americana detém 15%, o tipo lisa 10%, enquanto

outros tipos (vermelha, mimosa, romana, etc.) correspondem a 5% do mercado (COSTA & SALA, 2005).

O Estado de São Paulo é um dos principais produtores de alface do País, com uma área cultivada de 5.842 ha e produção de 47.056 toneladas no ano de 2008 e movimentou R\$ 34.492.111,04 (IEA, 2009). Segundo dados da CEAGESP para o quinquênio 2000-2004, o tipo crespa foi o mais consumido no Estado, com participação de 61% dos engradados comercializados, seguido do tipo americana com 19%, do tipo lisa com 18% e do tipo romana com 2%, sendo que o tipo mimosa foi considerado como crespa (TRANI et al., 2005).

Entre os problemas fitossanitários da cultura da alface estão as doenças causadas por vírus. Na cultura da alface predominam o *Lettuce mosaic virus*, causador do mosaico da alface e os vírus do gênero *Tospovirus*, causando a doença conhecida como vira-cabeça (SALAS, 2001).

Em 2004 foi verificada a ocorrência de Bidens mosaic virus (BiMV) causando sintomas de mosaico em alface no município de São Manuel-SP. Até então o BiMV havia sido relatado infectando alface esporadicamente, mas nunca causando perdas reais no campo. Estudos preliminares conduzidos com este isolado demonstraram uma gama de hospedeiros distinta da relatada para outros isolados de BiMV (KITAJIMA et al., 1961; HASEGAWA, 2006; INOUE-NAGATA et al., 2006).

Inoue-Nagata et al. (2006), questionaram a posição taxonômica do BiMV, propondo que o BiMV é um membro da espécie *Potato virus Y* (PVY), segundo os atuais critérios de demarcação de espécies do ICTV utilizando a identidade de aminoácidos na região codificadora para a proteína capsidial. Entretanto Silva et al. (2007), estudando um fragmento correspondente à região HC-Pro de um isolado de BiMV, concluíram que o mesmo não seria membro da espécie PVY baseando-se nesta região do genoma.

Portanto os objetivos deste trabalho foram: realizar a caracterização molecular e biológica do BiMV; realizar a purificação viral e obter um antissoro policlonal; avançar no sequenciamento completo de um isolado de BiMV proveniente de picão preto permitindo melhor esclarecimento da posição taxonômica deste vírus; obter oligonucleotídeos específicos para diagnose molecular do vírus e avaliar a ocorrência do BiMV no campo em três regiões produtoras de alface.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* constitui a maior família de vírus de plantas. Apresentam RNA de fita simples, sentido positivo, genoma poliadenilado, encapsidados em partículas alongadas flexuosas (BERGER et al., 2005).

A família *Potyviridae* é dividida em seis gêneros (*Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus* e *Macluravirus*), de acordo com a espécie de inseto vetor e número de componentes do genoma viral (BERGER et al., 2005). A organização do genoma é conservada dentro da família e consiste em uma sequência compacta de 10 proteínas, exceto em *Bymovirus* que apresenta genoma bipartido com 8 proteínas correspondentes às proteínas dos outros membros a partir da porção terminal 3' e uma porção com menor homologia com os outros membros (SHUKLA et al., 1998). A família *Potyviridae* possui similaridade com membros das famílias *Comoviridae*, *Picornaviridae* e *Hypoviridae*. Os genomas dos membros destas famílias são RNA sentido positivo, exceto *Hypoviridae* que apresenta RNA de fita dupla. A maioria tem a proteína VPg no terminal 5' e cauda poliadenilada no terminal 3'. Os genomas são expressos em uma poliproteína precursora que são processadas por proteases codificadas pelo vírus. Os genes envolvidos na replicação são conservados entre os gêneros (BERGER et al., 2005).

O gênero *Bymovirus* ainda se destaca dos demais gêneros pela transmissão através de fungos plasmodióforos. *Ipomovirus* é constituído por 3 espécies transmitidos por mosca-branca. *Macluravirus* é constituído por 3 espécies transmitidas por afídeos e tamanho da partícula inferior a 700 nm. *Rymovirus* e *Tritimovirus* possuem 3

espécies cada e infectam hospedeiras da família *Graminae*, sendo que ambos os gênero tem sua transmissão realizada por ácaros. Dentro da família *Potyviridae*, o maior gênero é o *Potyvirus*, apresentando partículas com tamanho acima de 700 nm e transmissão por afídeos de maneira não-persistente (BERGER et al., 2005). Esse gênero parece englobar os vírus mais bem sucedidos em infectar plantas (SHUKLA et al., 1994).

O gênero *Potyvirus* possui 111 espécies reconhecidas e 86 espécies tentativas (BERGER et al., 2005). No ano de 2006 os bancos de dados de sequências internacionais apresentavam mais de 250 sequências completas de genomas de potyvírus, representando 47 espécies (ZHENG et al., 2008). Possui como espécie tipo o *Potato virus Y* (PVY), apresentam partículas de tamanho entre 680 a 900 nm de comprimento e entre 11 e 13 nm de largura com simetria helicoidal e espessura de 3,4 nm, com cerca de 5% da massa constituída de ácido nucleico. O coeficiente de sedimentação é de 137 a 160 S, a densidade em gradiente de cloreto de céσιο de 1,31 g/cm³ e coeficiente de extinção entre 2,4 e 2,7. Apresentam a proteína VPg de 24 kDa ligada covalentemente ao terminal 5', o genoma possui cerca de 9,7 Kb de extensão e apresenta poli A no terminal 3' (BERGER et al., 2005).

O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por aproximadamente 2.200 cópias de um polipeptídeo com massa molecular em torno de 34 kDa. 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 de 18-20 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., 1994).

A estratégia de replicação se baseia na tradução de uma grande poliproteína precursora que codifica três tipos de proteases que clivam a poliproteína em sítios específicos, formando 10 proteínas virais (ADAMS et al., 2005b) (Figura 1).

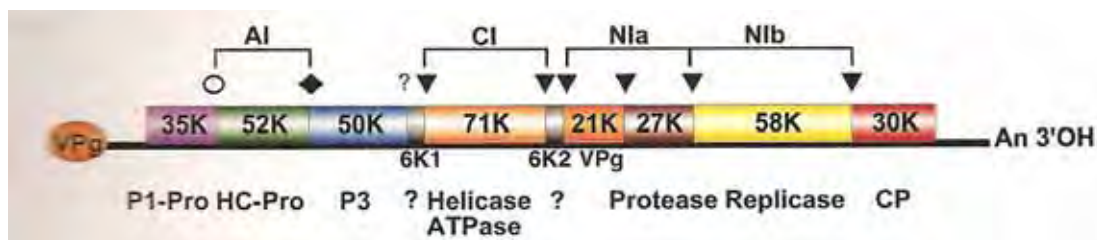


Figura 1. Organização genômica do vírus *Tobacco etch virus* (TEV), gênero *Potyvirus*. A linha escura representa o RNA sentido positivo e os retângulos coloridos representam as ORF. Os símbolos acima das ORF representam os sítios de clivagem das proteases (retirado de Berger et al., 2005).

Essa é uma das mais bem caracterizadas famílias de vírus de plantas, devido à grande importância econômica de seus membros, fácil transmissão via extrato vegetal, a relativa facilidade de purificação das partículas virais e do RNA e disponibilidade de sequências de nucleotídeos (ZERBINI & MACIEL-ZAMBOLIM, 1999).

A disponibilidade de sequências da proteína capsidial e posteriormente do genoma completo tem contribuído para o estabelecimento de critérios para separação de estirpes e espécies de vírus neste gênero (ADAMS et al., 2005b). Os primeiros estudos realizados com sequências de aminoácidos da proteína capsidial mostraram uma identidade de 38 a 71% entre espécies diferentes e de 90 a 99% para estirpes do mesmo vírus (SHUKLA & WARD, 1988). Já outro estudo, com sequências de aminoácidos na mesma região entre diferentes gêneros da família, mostrou similaridades entre 17 a 32% (WARD & SHUKLA, 1994). No entanto, estas comparações tem sido questionadas, pois a sequência da proteína capsidial corresponde a menos de 10% do genoma viral (BOS, 1992), mas tem sido muito utilizada pela facilidade em sua obtenção e disponibilidade de sequências para comparação (HA et al., 2008).

Adams et al. (2005b) comparou todas as sequências completas da família *Potyviridae* disponíveis até então no Gen Bank, analisando cada gene e a região não traduzida (UTR) e determinou qual gene separadamente reflete com maior acurácia o genoma completo. Os diferentes gêneros da família apresentaram identidade abaixo de 46% para sequência de nucleotídeos do genoma viral e abaixo de 33% para sequência de aminoácidos do

genoma viral. Entre as espécies de um mesmo gênero obteve-se para o genoma completo identidade na sequência de nucleotídeos de 49 a 58% e de 42 a 56% na sequência de aminoácidos. Os autores concluíram que os valores de demarcação de espécies situaram-se em 75 a 76% de identidade de nucleotídeos e entre 81 a 82% de identidade de aminoácidos para o genoma viral completo.

O ICTV, em sua 8ª reunião, adotou como critério para demarcação de espécies na família identidade de nucleotídeos na sequência completa do genoma inferiores a 85% e identidade de aminoácidos para proteína capsidial abaixo de 80% (BERGER et al., 2005). Contudo, Adams et al. (2005b) concluíram que um valor preciso de demarcação de espécies no valor de identidade de nucleotídeos é dado apenas pelos genes CI e HC-Pro. A demarcação de gêneros pode ser definida precisamente pela região HC-Pro. Os genes P1 e P3 apresentaram a maior variabilidade entre as sequências estudadas e as regiões da proteína capsidial e UTR do terminal 3', que geralmente são utilizadas em estudos taxonômicos, não tiveram acurácia considerável em relação ao genoma completo. Foram desenvolvidos oligonucleotídeos universais para as regiões CI e HC-Pro de *Potyvirus* o que deve facilitar a obtenção de novas sequências de genomas completos (HA et al., 2008).

Além das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, o ICTV utiliza os seguintes critérios para demarcação de espécies no gênero *Potyvirus*: diferentes sítios de clivagem da poliproteína, gama de hospedeiros, diferentes morfologias de inclusão, ausência de proteção cruzada, transmissão ou não por sementes, reações de hospedeiros (interações genéticas), diferenças sorológicas e vetores primários diferentes (BERGER et al., 2005).

Adams et al. (2005a) compilou informações sobre os sítios de clivagem de diversos membros da família *Potyviridae* e concluiu que sete dos nove sítios de clivagem existentes nas espécies são clivados pela protease NIa-Pro. Usualmente os sítios de clivagem são demonstrados com 4 aminoácidos antes do sítio de clivagem e um depois, como pode ser observado para o sítio de clivagem entre as proteínas P3 e 6K1 no PVY, representado por VRHQ/R (ADAMS & ANTONIW, 2009). O banco de dados DPVweb (www.dpvweb.net) apresenta os sítios de clivagem existentes para a família *Potyviridae*, a partir das sequências deduzidas de aminoácidos disponíveis. A tabela 1 resume os sítios de clivagem existentes no gênero *Potyvirus*.

Tabela 1. Dipeptídios existentes nos sítios de clivagem de espécies do gênero *Potyvirus*, de acordo com as proteínas virais clivadas e proteases específicas (Adaptado de Adams & Antoniw, 2009).

| Sítio de clivagem* | Número de espécies com sequências disponíveis | | | | | | | | |
|--------------------|---|-----------------|------------------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|
| | Protease P1 | Protease HC-Pro | Protease NIa-Pro | | | | | | |
| | P1/HC-Pro | HC-Pro/P3 | P3/6K1 | 6K1/CI | CI/6K2 | 6K2/VPg | VPg/NIa | NIa/Nib | Nib/CP |
| E/A | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 10 | 0 | 0 |
| E/G | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 3 | 10 | 0 | 1 |
| E/S | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 19 | 1 | 0 |
| Q/A | 0 | 0 | 25 | 4 | 1 | 3 | 0 | 6 | 37 |
| Q/G | 0 | 0 | 1 | 3 | 6 | 29 | 0 | 13 | 13 |
| Q/S | 0 | 0 | 3 | 30 | 25 | 0 | 0 | 17 | 46 |
| Q/T | 0 | 0 | 1 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| S/S | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y/A | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y/N | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y/S | 39 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y/T | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F/A | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F/S | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G/G | 0 | 59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Dipeptídios- A:Alanina, E:Ácido Glutâmico, F: Fenilalanina, G: Glicina, N: Asparagina, Q:Glutamina, S:Serina, T: Treonina, Y:Tirosina

Muitas proteínas virais presentes no gênero *Potyvirus* são multifuncionais, sendo que as proteínas P1, HC-Pro, P3, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro e Nib estão envolvidas na replicação do RNA (ZERBINI et al., 2002). Urchunqui-Inchima et al. (2001) apresentaram uma revisão das funções e propriedades biológicas das proteínas presentes no gênero *Potyvirus*.

A proteína P1 tem entre 32 a 64 kDa e funções de proteinase, autoclivagem do terminal carboxila e interfere na sintomatologia (RYAN & FLINT, 1997). A proteína HC-Pro tem tamanho entre 56 a 58 kDa e está envolvida na transmissão por afídeos, interação própria, movimento sistêmico, supressão do silenciamento gênico, sinergismo e desenvolvimento de sintomas, proteinase e autoclivagem do carboxi-terminal (MAIA et al., 1996).

A proteína P3 apresenta tamanho de 37 kDa e função relacionada à patogenicidade e a proteína 6K1 apresenta função desconhecida (RODRIGUEZ-CEREZO et al., 1993; LANGENBERG & ZHANG, 1997). A proteína CI possui tamanho de 70 kDa e tem função de helicase e movimento célula-a-célula (LAIN et al., 1990; CHEN et al., 1994). A proteína 6K2 tem função de ancorar o complexo replicativo às membranas da célula (RESTREPO-HARTWIG & CARRINGTON, 1992; 1994).

A proteína NIa (VPg-Pro) possui tamanho de 49 kDa e tem função de localização celular, proteinase e interações proteína-proteína (RIECHMANN et al., 1992; HONG et al., 1995). A proteína NIb possui tamanho de 58 kDa e função de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (HONG & HUNT, 1996) e a proteína CP (proteína capsidial) possui tamanho entre 28 a 40 kDa e está envolvida na transmissão por afídeos, movimento célula-a-célula e sistêmico e na montagem da partícula viral (SHUKLA & WARD, 1989; KASTEEL et al., 1993).

Existe uma série de aminoácidos conservados entre as espécies do gênero *Potyvirus*. Zheng et al. (2008) enumeraram estes aminoácidos conservados e as variações que podem ocorrer entre as espécies. Na região correspondente à proteína CI os principais são: ATNIIENGV, parcialmente descrito por Nicholas & Laliberte (1991), K(V/I)DGR(T/S)M e VGSGKST. Na região correspondente à NIb os principais são: CVDDFN, (A/S)M(I/V)E(S/A)WG, GNNSGQ descrito por Gibbs & Mackenzie (1997), GQPSTVVD, FTAAP(L/I)(D/E) e DGS(Q/R)FDS. Na região da CP são: E(N/D)TERH, QMKAAA (LANGEVELD et al., 1991 e PAPPU et al., 1993), YAFDFYE, MVWCI(E/D)NG, parcialmente descrito por Langeveld et al. (1991) e Pappu et al. (1993), W(V/T)MMDG(D/E/N), (P/R/A)YMPRYG e (A/S)SYN(E/D)VD.

Alguns aminoácidos têm a função conhecida, como o DAG na região da proteína capsidial e GDD na região da NIb, responsável pela transmissão por afídeos e o último presente em todas RNAs polimerases dependentes de RNA (RdRp) (DUJOVNY et al., 2000; URCUQUI-ICHINA et al., 2001). Nas regiões N-terminal e central da proteína HC-Pro também existem os aminoácidos conservados relacionados à transmissão por afídeos: K(I/L)(T/S)C e PTK respectivamente. Além destes os presentes na região central desta proteína, o IGN e C(C/S)C tem função na amplificação do RNA e movimento sistêmico,

respectivamente (URCUQUI-ICHINA et al., 2001). Na proteína VPg há os aminoácidos H(N)MYG responsáveis pela ligação ao RNA viral (HA et al., 2008).

4.2. Principais vírus que infectam alface

No Brasil, vírus infectando a cultura da alface foram relatados desde a década de 1940. Tais ocorrências foram primeiramente descritas nos arredores da capital de São Paulo, em áreas intensamente exploradas. As viroses descritas eram transmitidas principalmente por sementes e afídeos (KRAMER et al., 1945).

Brunt et al. (1990) citam que muitas plantas invasoras, ornamentais e cultivadas, pertencentes à família Asteraceae, são hospedeiras naturais dos vírus que infectam a cultura da alface, sendo possivelmente, reservatórios de vírus no campo.

As principais espécies de vírus serão descritas a seguir.

4.2.1 *Lettuce mosaic virus* – LMV

Lettuce mosaic virus – LMV é considerado o vírus mais importante nesta cultura (KRAUSE-SAKATE et al., 1999). Encontra-se disseminado por todo o mundo, provavelmente através do intercâmbio de sementes contaminadas (DINANT e LOT, 1992). Pertence ao gênero *Potyvirus* e possui partículas com cerca de 730 nm de comprimento por 13 nm de diâmetro (MURPHY et al., 1995).

Apresenta uma gama de hospedeiros bem ampla, podendo infectar 121 espécies vegetais pertencentes à 17 famílias botânicas (PAVAN et al., 2005). Pode ser transmitido pela semente, podendo esta ser infectada tanto pelo pólen como pelo óvulo (RYDER, 1964). A porcentagem de transmissão pode alcançar uma taxa de 16,5% em genótipos suscetíveis (JADÃO et al., 2002). A disseminação do LMV no campo ocorre por várias espécies de afídeos (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Acyrtosiphon scariole* e *Aphis gossypii*). Todos os ínstares podem transmitir o vírus (SYLVESTER, 1955) e *M. persicae* é considerado o vetor mais eficiente (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991).

Os sintomas da infecção pelo vírus incluem mosqueado, distorção e amarelecimento foliar em plantas adultas, podendo ocorrer má formação de cabeça.

Clareamento de nervuras e mosaico são comuns em plantas jovens e adultas, sendo que as folhas internas de plantas jovens permanecem pequenas (PAVAN & KUROSZAWA, 1997).

Os isolados podem ser classificados em patótipos, de acordo com a capacidade de infectar cultivares contendo vários genes de resistência. O patótipo I é incapaz de infectar cultivares com genes *Mo2*, *moI¹ moI²*, o patótipo II é capaz de infectar cultivares com o gene *Mo2*, o patótipo III é capaz de infectar cultivares com genes *Mo2* e *moI¹* e o patótipo IV é capaz de infectar cultivares com genes *Mo2*, *moI¹ moI²* (PINK et al., 1992). A maioria dos isolados de LMV se enquadra no patótipo II (REVERS et al., 1997).

Existe também a classificação dos isolados em dois sub-grupos: “Most”, para os isolados capazes de contornar os genes *moI¹ moI²* e transmitidos pela semente nestas cultivares e sub-grupo “Common” para os isolados capazes de infectar somente cultivares suscetíveis. Os isolados do sub-grupo Most estão disseminados em países da Europa e América do Sul (KRAUSE-SAKATE et al., 2002).

Nos E.U.A. a estratégia de controle mais utilizada para o LMV consiste na certificação de sementes. A tolerância é de zero sementes contaminadas em um lote de 30.000 sementes testadas através de DAS-ELISA (ZERBINI et al., 2002). No Brasil a estratégia de certificação de sementes não tem eficiência, pois praticamente durante o ano todo há condições para a proliferação e reovadas de afídeos (SALA & COSTA, 2005), além da presença de plantas hospedeiras que servem de fonte de LMV e cultivos extensivos e próximos uns aos outros. O uso de inseticidas como medida isolada não é satisfatória (PAVAN et al., 2005) visto que os inseticidas recomendados não são suficientemente rápidos para matar os vetores antes da inoculação dos vírus. Em certos casos ainda podem até aumentar a incidência dos vírus por eles transmitidos, em consequência da excitação causada pelos inseticidas durante as picadas de prova (SLEUTJES, 2003). Para o controle do LMV são indicadas uma série de medidas como eliminação de ervas daninhas e restos culturais e adoção de um período livre de alfaca na área (PAVAN et al., 2005).

4.2.2 – Vírus do complexo vira-cabeça

Os vírus do gênero *Tospovirus* causam a doença conhecida como vira-cabeça. Os tospovirus pertencem à família *Bunyaviridae* e infectando alfaca no Brasil foram verificadas as espécies *Groundnut ring spot virus* (GRSV), *Tomato chlorotic spot virus*

(TCSV) e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (DE ÁVILA, 1993, 1996; COLARICCIO et al., 1995). No Estado de São Paulo as espécies TCSV e GRSV são responsáveis por perdas de produção significativas em cultivos de alface (COLARICCIO et al., 2003a).

Os vírus apresentam três segmentos de RNA de fita negativa (PETERS et al., 1991) envoltos pela proteína capsidial e envelope lipoproteico. As partículas apresentam morfologia pleiomórfica (BLACK et al., 1963). São transmitidos por nove espécies de tripses (ordem Thysanoptera) (POZZER et al., 1996) e as epidemias são mais frequentes em épocas quentes e chuvosas (PAVAN & KUROZAWA, 1997). O tripses tem relação circulativa-propagativa, adquire o vírus durante o primeiro estágio larval e o transmite na fase adulta, durante toda a vida (WIJKAMP, 1995).

Os sintomas em alface são manchas necróticas e bronzeamento em folhas, geralmente em um lado da planta. A infecção sistêmica é caracterizada por uma murcha marginal, amarelecimento e bronzeamento de folhas internas e da nervura. É possível visualizar anéis necróticos (PAVAN & KUROZAWA, 1997).

A estratégia de controle depende do estágio da lavoura. Na fase pré-lavoura pode ser feita a rotação de culturas com espécies não hospedeiras e o controle de espécies hospedeiras alternativas aos vírus e vetores. Durante a lavoura devem ser usadas mudas saudáveis, controle químico com inseticidas e utilização de plantas armadilhas, barreiras e diminuição de operações de cultivo que favoreçam o movimento dos tripses. Na fase pós-colheita o controle é realizado através de alqueive e tratamento do solo (PAVAN et al., 2005).

4.2.3 Engrossamento das nervuras ou “big vein”

O “big vein” ou espessamento das nervuras vem sendo verificado no Brasil, especialmente no Estado de São Paulo desde 1998, principalmente nas épocas mais frias do inverno e primavera (COLARICCIO et al., 2003b). Desde 1934 tem sua ocorrência relatada nos E.U.A. (JAGGER, 1934) sendo também verificado em países da Europa e Japão (ROGGERO et al., 2003; KUWATA et al., 1983).

Dois vírus tem sido constatados em plantas com sintomas de “big-vein”, o *Lettuce big vein associated virus* (LBVaV) – gênero *Varicosavirus* e o *Mirafiori lettuce big vein virus* (MLBVV) – gênero *Ophiovirus* (ROGGERO et al., 2003;

NAVARRO et al., 2004; SANCHES et al., 2007). Porém a ocorrência de sintomas é atribuída apenas ao MLBVV (LOT et al., 2002; NAVARRO et al., 2004).

Ambos os vírus são transmitidos por um fungo de solo, *Olpidium brassicae* (LOT et al., 2002), o qual pode permanecer viável por até 26 anos devido a presença de esporos de resistência, os oósporos. A infecção com o vírus ocorre através de zoósporos que se movimentam na presença de água no solo e infectam raízes sadias (CAMPBELL, 1996) sendo que em cultivos hidropônicos pode ocorrer até 100% de infecção, assim como em solos encharcados e mal drenados (KRAUSE-SAKATE et al., 2003).

Os principais sintomas são o espessamento de nervuras, enrugamento das folhas, presença de bolhosidades e má formação de cabeça, principalmente em alface do tipo americana (ZINK & GROGAN, 1954; KRAUSE-SAKATE et al., 2003). Em períodos mais quentes, plantas com presença de ambos os vírus permanecem assintomáticas (NAVARRO et al., 2004; SANCHES et al., 2007).

As principais medidas de controle consistem em evitar a contaminação do solo pelo fungo, evitar solos encharcados e mal drenados além de controlar a água da irrigação (JONES, 2003; LATHAM & JONES, 2004). As cultivares resistentes já são disponíveis nos EUA (HAYES et al., 2006).

4.2.4. Lettuce mottle virus (LeMoV)

O LeMoV é um possível membro do gênero *Sequivirus*. (JADÃO, 2004). Apresenta partículas isométricas com aproximadamente 30 nm de diâmetro, ocorre em baixas concentrações no extrato foliar e é transmitido via extrato vegetal tamponado (MARINHO et al., 1982).

Oligonucleotídeos específicos para LeMoV são disponíveis para a detecção em RT-PCR (transcriptase reversa e reação em cadeia de polimerase em uma única etapa) (JADÃO, 2004). Estudos de incidência do LeMoV em diferentes regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo foram realizados, mostrando que aproximadamente 10% das amostras coletadas com sintomas de mosaico e mosqueado no campo estavam infectadas por este vírus, tanto em infecção isolada como em infecção mista com o LMV (KRAUSE-SAKATE et al., 2008).

Os sintomas do LeMoV quando isolados podem se confundir com os causados pelo LMV, sendo porém mais fracos, sob a forma de um mosqueado salpicado e sem necrose (PAVAN et al., 2005).

Dados preliminares indicam que o LeMoV é transmitido pelo afídeo *Hyperomyzus lactucae* e não é transmitido por semente. A principal medida de controle é a produção de mudas em condições protegidas de pulgões e evitar a presença de plantas daninhas hospedeiras (PAVAN et al., 2005).

4.2.5. Bidens mosaic virus

4.2.5.1 Transmissão e sintomatologia

O Bidens mosaic virus (BiMV) é atualmente uma espécie tentativa do gênero *Potyvirus* (BERGER et al., 2005). Foi descrito inicialmente por Kitajima et al. (1961) infectando plantas de picão preto (*Bidens pilosa*), sendo transmitido experimentalmente a partir de extrato vegetal para plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* Turkish), girassol (*Helianthus annuus*), erva-de-Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides*), fedegoso (*Cassia occidentalis*), cordão-de-frade (*Leonotis nepaetifolia*), *C. amaranthicolor* e *Physalis floridana*. Em picão-preto os sintomas principais são mosaico, nervuras esverdeadas, manchas cloróticas sistêmicas e deformação das folhas novas (KUHN et al., 1980).

Posteriormente, o BiMV, também foi relatado ocorrendo naturalmente em *Emilia sonchifolia*, *Acanthospermum hispidum* e em alface (COSTA & KITAJIMA, 1966). A ocorrência de sintomas em gama de hospedeiras causados por diferentes isolados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Espécies hospedeiras e ocorrência de sintomas induzidos por isolados de BiMV estudados por diferentes autores.

| Espécie hospedeira | Hospedeiro de origem | | | |
|----------------------------------|--|--|---|--|
| | <i>Bidens pilosa</i> (Kuhn et al. 1980) | <i>Coreopsis lanceolata</i> (Rodrigues et al. 1991) | <i>Pisum sativum</i> (Nagata et al., 1995) | <i>Bidens pilosa</i> (Hasegawa, 2006) |
| <i>Acanthospermum hispidum</i> | + | — | — | — |
| <i>Amaranthus</i> sp | + | - | — | — |
| <i>Callistephus chinensis</i> | + | — | — | — |
| <i>Cassia occidentalis</i> | + | — | — | — |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> | + | + | + | + |
| <i>C. quinoa</i> | + | + | + | + |
| <i>Coreopsis lanceolata</i> | — | + | — | — |
| <i>Emilia sonchifolia</i> | + | - | — | — |
| <i>Helianthus annuus</i> | + | + | + | + |
| <i>Lens culinaris</i> | — | — | + | — |
| <i>Lupinus albus</i> | + | — | — | — |
| <i>Lupinus angustifolium</i> | + | — | — | — |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | + | — | + | — |
| <i>N. clevelandii</i> | + | — | + | + |
| <i>N. debney</i> | + | + | — | — |
| <i>N. occidentalis</i> | + | — | — | + |
| <i>N. rustica</i> | + | - | + | + |
| <i>N. tabacum</i> | +* | +** | +*** | +**** |
| <i>N. glutinosa</i> | + | - | — | — |
| <i>Petunia hybrida</i> | + | — | + | — |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | - | - | + | - |
| <i>Physalis floridana</i> | + | — | - | — |

(Continuação)

| Espécie hospedeira | Hospedeiro de origem | | | |
|--------------------------|--|--|---|--|
| | <i>Bidens pilosa</i> (Kuhn et al. 1980) | <i>Coreopsis lanceolata</i> (Rodrigues et al. 1991) | <i>Pisum sativum</i> (Nagata et al., 1995) | <i>Bidens pilosa</i> (Hasegawa, 2006) |
| <i>Pisum sativum</i> | + | - | + | + |
| <i>Sesamum indicum</i> | — | — | + | — |
| <i>Solanum nigrum</i> | + | — | — | — |
| <i>Spinacia oleracea</i> | — | — | + | — |
| <i>Vicia faba</i> | — | — | + | — |
| <i>Zinnia elegans</i> | + | - | — | — |

*N. tabacum cv. “White Burley”, “BS”, “Havana 38”, “Havana 42”, “TNN”, “Turkish” e “Xanthi”; ** cv. TNN e Turkish; ***cv. TNN; ****cv. Turkish.

+ com sintomas, - sem sintomas ___ não testada

Em alface, Kuhn et al. (1980) realizaram experimentos de inoculação com extrato vegetal em seis cultivares de alface. As cultivares “Baba”, “Crespa Hanson” e “Grand Rapids” apresentaram manchas cloróticas arredondadas, porém a transmissão foi muito baixa e os sintomas pouco perceptíveis. Já as cultivares “Brasil 221”, “Brasil 48” e “White Boston” reagiram com numerosas manchas cloróticas nas folhas inoculadas, evoluindo sistemicamente para as folhas em desenvolvimento, ocorrendo mosaico, clareamento de nervuras e deformação das folhas novas, sendo que algumas plantas apresentaram o tamanho das folhas e da planta bastante reduzido.

Hasegawa (2006) realizou uma triagem de cultivares de alface, visando a resistência ao BiMV. Foram inoculados 89 cultivares através de inoculação com extrato vegetal e todas as cultivares do grupo repolhuda lisa nacionais se mostraram suscetíveis ao BiMV.

O vírus é transmitido pelas espécies de afídeos *Myzus persicae* (KUHNS et al., 1980 e NAGATA et al., 1995), *Aphis coreopsidis* e *Dactynotus* sp. de maneira não circulativa (KUHNS et al., 1980). Em alface “Brasil 48” “Brasil 221” “White Boston” “Crespa Hanson” “Baba” e “Grand Rapids” e ervilha “Torta de Flor Roxa” foi observada a transmissão através de *Myzus persicae* (KUHNS et al., 1980; NAGATA et al., 1995). Não foi

observada transmissão para *Coreopsis lanceolata* através das espécies *Myzus persicae*, *Hyperomyzus lactucae* e *Aphis* sp. (RODRIGUES et al., 1991).

Não foi verificada transmissão por semente do BiMV a partir de plantas de picão preto, *Emilia sonchifolia*, girassol e alface (KUHN et al., 1980), ervilha e lentilha (*Lens culinaris*) (NAGATA et al., 1995).

4.2.5.2. Propriedades e características do vírus

O vírus foi descrito inicialmente apresentando partículas com 720 nm x 12-13 nm (KITAJIMA et al., 1961). Kuhn et al. (1982) encontraram partículas com comprimento de 735 nm e presença de inclusões laminares do tipo catavento, típica dos membros do gênero *Potyvirus*. Rodrigues et al. (1991) relataram a presença de partículas com 700-750 nm x 15 nm e também verificaram a presença de inclusões do tipo catavento, além de inclusões em linhas paralelas e eventuais bandas de lamelas sobrepostas em plantas de *Coreopsis lanceolata*. Nagata et al. (1995) observaram em plantas de ervilha partículas de 700-800 nm x 15 nm e também inclusões do tipo catavento.

O BiMV é inativado no extrato foliar mantido na temperatura entre 55 a 60° C por 10 minutos e nas diluições acima de 10^{-3} e também quando conservado após 5 dias a 24-26° C e após 21 dias a 4-5° C (KUHN et al., 1982)..

O vírus é facilmente transmitido por inoculação via extrato vegetal preparado com tampão fosfato de 0,01 a 0,5 M e numa faixa de pH entre 6,5 a 8,0. Entretanto, melhores resultados foram obtidos com tampão de molaridade entre 0,01 a 0,03 M e pH entre 7,0 e 7,5. A adição de Na_2SO_3 ou 2-mercaptoetanol, como antioxidante não melhorou a transmissão (KUHN et al., 1980).

Diversos autores obtiveram sucesso na purificação do BiMV, apesar de Kuhn et al. (1982) relatar a baixa concentração do BiMV nas hospedeiras, e obtenção de purificações parciais apenas, utilizando-se n-butanol (8% v/v) para clarificação do extrato. Ainda segundo os autores, a melhor hospedeira para multiplicação do vírus foi *Nicotiana tabacum* TNN, sendo que as folhas apresentaram maior concentração de partículas que o caule.

Rodrigues et al.(1991) obtiveram sucesso na purificação de BiMV com um protocolo envolvendo essencialmente extração com tampão fosfato, clarificação com

n-butanol, precipitação com polietilenoglicol (PEG)6000 e centrifugação isopícnicamente em cloreto de céσιο. Utilizando-se alfaca “Eiffel Tower” como multiplicadora obtiveram 5 mg de vírus/100 g de tecido foliar. Nagata et al. (1995) utilizaram ervilha “Torta de Flor Roxa” como hospedeira de multiplicação e um método que consistiu em homogeneizar o tecido com tampão borato, filtração, adição de Triton X-100, cloreto de sódio e PEG-6000 e centrifugação isopícnicamente com cloreto de céσιο.

Todos os anti-soros para detecção de BiMV foram obtidos através da imunização em coelhos (KUH N et al., 1982; RODRIGUES et al., 1991; NAGATA et al., 1995). Kuhn et al. (1982) obtiveram um anti-soro que reagiu com o extrato de plantas infectadas até a diluição 1:2048 e de plantas sadias até a diluição 1:256. Para eliminar a reação com extrato de plantas sadias, foi elaborado um teste de dupla difusão em agar gel com 0,85% de NaCl e 3% de SDS. Nagata et al. (1995) obtiveram um anti-soro que também apresentou reação não-específica com extrato de plantas sadias, sendo realizada a absorção do anti-soro com o extrato da planta sadia. Através de testes de “western blotting” se determinou que a proteína capsidial do isolado de BiMV apresentou tamanho de 33 kDa, e foi eficaz em testes de Dot-ELISA e DAS-ELISA. Rodrigues et al. (1991) obtiveram um anti-soro com título 1/64 e utilizado em testes de dupla difusão em agar-gel.

Sequências nucleotídicas da região terminal 3' de um isolado de BiMV proveniente de picão e outro proveniente de ervilha, ambos coletados no Distrito Federal, foram obtidas por Inoue-Nagata et al. (2006). Os fragmentos contêm 1702 nucleotídeos. A identidade entre os dois isolados foi de 98% e ambos contêm uma sequência deduzida de 482 aminoácidos, correspondente à parte da proteína NIB e a proteína capsidial (CP) completa. Ambos apresentaram o sítio de clivagem Q/A entre a Nib e CP e o motivo DAG na região da CP. A CP apresentou 216 aminoácidos e peso molecular estimado em 30 kDa. A região UTR no terminal 3' apresentou 253 nucleotídeos nos dois isolados.

Hasegawa (2006) também amplificou um fragmento de 800 nucleotídeos de um isolado proveniente de picão, coletado no Estado de São Paulo. O fragmento corresponde à região da CP e Nib e apresentou 96% de identidade com o isolado proveniente de ervilha do Distrito Federal. Silva et al. (2007) amplificou uma sequência de 2000 nucleotídeos correspondentes à região da HC-Pro dos *Potyvirus*.

Existem evidências de um relacionamento próximo do BiMV com outras espécies de potyvírus. O *Bidens mottle virus* (BiMoV) é uma espécie descrita no estado da Flórida (E.U.A.) originalmente isolado de picão preto e que infecta alface (CHRISTIE et al., 1968; PURCIFULL et al., 1976). Os dois vírus infectam 10 hospedeiras em comum, entretanto há distinção de sintomas em algumas hospedeiras. O BiMoV causa sintomas sistêmicos em *C. quinoa* e *C. amaranticolor*, enquanto o BiMV causa apenas lesões locais. No girassol o BiMV induz necrose foliar e o BiMoV não. *N. tabacum* “Turkish” e *N. glutinosa*, *Pisum sativum* e *Cassia occidentalis* são hospedeiras de BiMV e não-hospedeiras de BiMoV (KUHN et al., 1978; 1980).

Em testes sorológicos de dupla difusão em ágar não foi observada reação entre o anti-soro contra BiMoV e o extrato de plantas infectadas com BiMV, assim como não ocorreu reação entre o anti-soro contra BiMV e o extrato de plantas infectadas com BiMoV (KUHN et al., 1982).

Recentemente, em 2008, foi publicada uma sequência de BiMoV, contendo 1800 nucleotídeos correspondentes ao terminal 3', englobando a NIB e CP. A análise filogenética deste fragmento mostrou que se trata de uma espécie distinta do BiMV pelos atuais critérios do ICTV (YOUSSEF et al., 2008). Liao et al. (2009) publicaram uma sequência completa de um isolado de BiMoV, com uma gama de hospedeiros restrita a girassol, *N. benthamiana*, *C. quinoa* e *C. amaranticolor*. Este isolado apresentou de 96% a 98% de identidade na região terminal 3' com outros isolados de BiMoV disponíveis no Gen Bank, sendo que a identidade de nucleotídeos com um isolado de BiMV foi inferior a 84%.

Sunflower chlorotic mottle virus (SCMoV) é outro vírus relacionado ao BiMV, que infecta picão preto, *Zinnia elegans*, girassol, *C. amaranticolor* mas não causa sintomas em ervilha, alface, *Nicotiana clevelandii* e *N. benthamiana* (DUJOVNY et al., 1998). Maritan et al. (2004) identificou um isolado de SCMoV infectando *Zinnia elegans* no Brasil e que apresentou reação com o anti-soro contra BiMV, mas que não infectou picão preto.

Através de comparações entre as sequências de BiMV, SCMoV e *Potato virus Y* (PVY), Inoue-Nagata et al. (2006) propôs que eles fariam parte da mesma espécie, segundo os atuais critérios do ICTV, já que a identidade de aminoácidos na região da proteína capsidial está acima dos 80% entre estas espécies. O PVY e BiMV também apresentam um relacionamento sorológico em testes de Dot-ELISA e western-blotting. Em

testes de DAS-ELISA, contudo, não ocorreu relacionamento entre os dois vírus (NAGATA et al., 1995). Atualmente o SCMoV é considerado uma espécie distinta pelo ICTV (BERGER et al., 2005).

Comparações entre a sequência obtida na região da HC-Pro de BiMV e sequência de outros vírus do Gen Bank indicaram uma identidade de aminoácidos de 81% com PVY e 80% com TuMV (SILVA et al., 2007). Estes valores estão abaixo dos sugeridos como critério de demarcação de espécies baseados no gene HC-Pro, acima de 85% para sequência de aminoácidos (ADAMS et al., 2005b).

O vírus tem causado prejuízos em culturas de girassol (COSTA & KITAJIMA, 1966), não se verificando cultivares resistentes ao vírus (KUHN et al., 1980). Em plantas de *Zinnia elegans* pode causar prejuízos em virtude de comprometer a coloração das pétalas florais (KUHN et al., 1980; MARITAN et al., 2004). Em ervilha também tem sido verificada a ocorrência do vírus em cultivos comerciais (NAGATA et al., 1995).

Em alface, Hasegawa (2006) concluiu que a maioria dos cultivares são resistentes ou tolerantes ao BiMV. No entanto, todas as alfaces do grupo repolhuda lisa nacionais se mostraram suscetíveis ao vírus, o que faz do vírus um potencial problema nas regiões produtoras deste grupo de alface.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Manutenção dos isolados virais

Os trabalhos foram realizados com dois isolados virais, sendo o isolado coletado a partir de alface no município de São Manuel, SP denominado de BiMV-13 e o isolado coletado a partir de *B. pilosa*, em Botucatu, SP, denominado de BiMV-SP. Os isolados foram mantidos por meio de inoculações via extrato vegetal, em plantas de *Chenopodium quinoa* e alface cultivar “Trocadero”, utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,0. Como abrasivo foi utilizado o Carborundum (600 mesh) misturado no inóculo após o seu preparo.

As amostras de folhas foram cortadas em finas tiras e dessecadas com cloreto de cálcio e armazenadas em refrigerador à temperatura de 4° C para a desidratação das folhas. Os frascos foram vedados, etiquetados e armazenados a -20° C (BOS, 1977), visando preservar a infectividade original.

5.2. Caracterização biológica dos isolados

Foram realizadas três passagens por monolesionais para purificação biológica dos isolados. Utilizaram-se plantas de *C. quinoa* que reagem com lesões locais cloróticas antes que o vírus a infecte sistemicamente. As lesões individualizadas nas folhas foram retiradas por meio de estilete e maceradas em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0

e inoculadas em folhas de novas plantas de *C. quinoa*. Foram retiradas cerca de 15 lesões locais para recuperação de um isolado monolesional.

Após purificação biológica, o isolado BiMV-13 foi inoculado via extrato vegetal tamponado (vide item 5.1) nas seguintes espécies: *B. pilosa* (picão-preto), *C. quinoa*, *C. amaranthicolor*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Helianthus annuus* “Catissol”, *Nicotiana clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* “TNN”, *N. tabacum* “Havana 425”, *N. tabacum* “Turkish”, *N. tabacum* “Xanthii”, *N. benthamiana*, *Lycopersicon esculentum* ‘Santa Clara’, *Nicandra physaloides*, *Physalis floridana*, *Sonchus oleraceus*, *Pisum sativum*, *Zinnia elegans*, *Cucurbita pepo*, *Petunia hybrida* e *L. sativa* “Trocadero”. Para determinar possível resistência testaram-se as seguintes cultivares de alface: Regina, White Boston, Verônica, Lucy Brown, Rafaela, Tainá, Gizele, Vera e Laurel.

O isolado BiMV-SP foi inoculado nas seguintes espécies: *B. pilosa*, *C. quinoa*, *C. amaranthicolor*, *C. murale*, *Datura stramonium*, *G. globosa*, *Helianthus annuus* “Catissol”, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* “Havana 425”, *N. tabacum* “TNN”, *N. tabacum* “Turkish”, *N. tabacum* “Xanthii”, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *Lycopersicon esculentum* ‘Santa Clara’, *Nicandra physaloides*, *Sonchus oleraceus*, *Physalis floridana*, *Pisum sativum*, *Capsicum annum* “Magda”, *Amaranthus viridis*, *Datura metel*, *Zinnia elegans*, *Cucurbita pepo*, *Petunia hybrida* e a cultivar de *L. sativa* “Trocadero”.

As inoculações foram realizadas em seis plantas de cada espécie, conforme descrito anteriormente e as avaliações para presença de sintomas realizadas até os 25 dias após inoculação. As plantas assintomáticas foram retroinoculadas em *C. quinoa* para verificar presença de infecção latente ou testadas através de RT-PCR.

5.3. Caracterização molecular do isolado BiMV-13

5.3.1 Minipurificação viral seguido de extração de RNA total

Para realização da mini-purificação viral, segundo Lane (1992), 2 g de tecidos foliares de *C. quinoa* infectados pelo BiMV-13 aos 15 dias após a inoculação foram macerados em 15 mL de tampão citrato de amônia 0,1 M, pH 6,5, 150 µL de uma solução de iodoacetamida 0,25 M e 150 µL de uma solução de NaDieca 1,0 M. O extrato foi filtrado em

tubo de centrifuga usando gaze e centrifugado 10 minutos a 10.000g. Ao sobrenadante recolhido em novos tubos, foram adicionados 1 mL de Triton X-100 e realizada agitação utilizando-se vortex. Quando a solução ficou completamente dissolvida foram adicionados lentamente 5 mL de sacarose a 20% e realizada uma ultracentrifugação de 90 minutos à 126.000g. O sobrenadante foi descartado, o ‘pellet’ ressuscitado em 300 µL de tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2 e a solução centrifugada 5 minutos à 10.000g em centrifuga para tubos eppendorf. O ‘pellet’ foi descartado e o sobrenadante (mini-purificado) armazenado a 4 °C.

O RNA total foi extraído à partir de 200 µL de preparação viral purificada, adicionado-se 50 µL do tampão de extração (0,2 M glicina, 0,2 M NaCl, 0,02 M EDTA, pH 9,5). Esta mistura foi ajustada para 1,55% de SDS (p/v) e 100 µg/mL de ‘Proteinase’ K (GibcoBRL) e deixada à 37 °C durante 1 hora. O RNA foi extraído com igual volume de fenol/clorofórmio (1:1) e precipitado com 2,5 vezes o volume final após extração fenol/clorofórmio, de etanol 100%. O ‘pellet’ obtido foi lavado em etanol 70% e ressuscitado em 20 µL de água destilada esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

5.3.2. Reação de Transcrição Reversa (RT)

O RNA viral foi convertido em DNA complementar para ser utilizado nas reações de PCR com os oligonucleotídeos Poly T-PotyBamHI (5’ AGC TGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT 3’). A reação foi realizada em volume de 25 µL utilizando-se 1,5 µL da enzima *AMV* (*Avian myeloblastosis virus*) *Reverse Transcriptase* (Promega), 1 µL de dNTPs (25 µM) , 0,5 µL do oligonucleotídeo à 100 µM e 5 µL de RNA total extraído pelo método descrito anteriormente. A reação foi realizada de acordo com procedimentos descritos no catálogo para a enzima *AMV*.

5.3.3. Reação de PCR

Inicialmente se utilizou os pares de oligonucleotídeos Poly T-PotyBamHI e WCIEN (5’ ATG GTT TGG TGY GAR ATT 3’) descritos por Pappu et. al. (1993). Um alinhamento de nucleotídeos foi realizado entre as sequências de: BiMV (número

de acesso [AY960150](#) e proveniente de ervilha), BiMV (número de acesso [AY960151](#), proveniente de picão preto), SCMoV (número de acesso AF255677 e proveniente de girassol) e SCMoV número de acesso AY344048, proveniente de *Z. elegans*) e PVY-SN (número de acesso AJ439544). Foram identificadas regiões conservadas entre as sequências para síntese de oligonucleotídeos senso e antissenso (Tabela 3 e Figura 2).

Utilizou-se para a reação de PCR a enzima Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen), utilizando-se 5 µL de 10x High Fidelity PCR Buffer, 2 mM de MgSO₄, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de uma mistura de dNTP, 1 unidade de Platinum Taq High Fidelity, 3 µL de cDNA e água DEPC para completar o volume de 50 µL. As temperaturas e tempos da reação de PCR foram selecionadas de acordo com o T_m (Temperatura de Melting) de cada oligonucleotídeo e do tamanho do fragmento amplificado, respectivamente, conforme descrito na Tabela 3.

Foram retirados 5 µL da reação para análise no gel de agarose (0,9%) corado com brometo de etídio.

Tabela 3. Oligonucleotídeos desenhados para amplificação do genoma do BiMV-13

| Primer | Temperatura de melting (°C) | Sequência (5' para 3') ² |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| BiMV 7320 sens ¹ | 45,9 | GCACGGYTTYMAGAAGTGYG |
| BiMV 7763 sens | 52 | TTYGAYAGYTCAYTMACTCC |
| BiMV 7821 sens | 50 | TACATGGARGAYTGGGAT |
| BiMV 7885 ant | 57,9 | GTCTGGTGTGGCGATTGGCG |
| BiMV 7958 sens | 52,9 | GTGGCCAACCTTCTACAG |
| BiMV 8331 sens | 55,7 | CGTGGGGCTATCCTGAATTG |
| BiMV 8333 ant | 53 | CAATTCAGGATAGCCCCAC |
| BiMV 8439 ant | 58,1 | CGACGCAGAGCCATACTCG |
| BiMV 8851 sens | 64 | AGGCAGTTCGCACGGCATAAC |
| BiMV 9046 ant | 55,8 | CCACATCAGAGAAGTGTGCC |
| BiMV 9211 sens | 62 | CTTCATCTGGATGTGTGCTTC |

¹ **sens**: polaridade senso **ant**: polaridade anti-senso. ² **Y**: C/T **M**:C/A

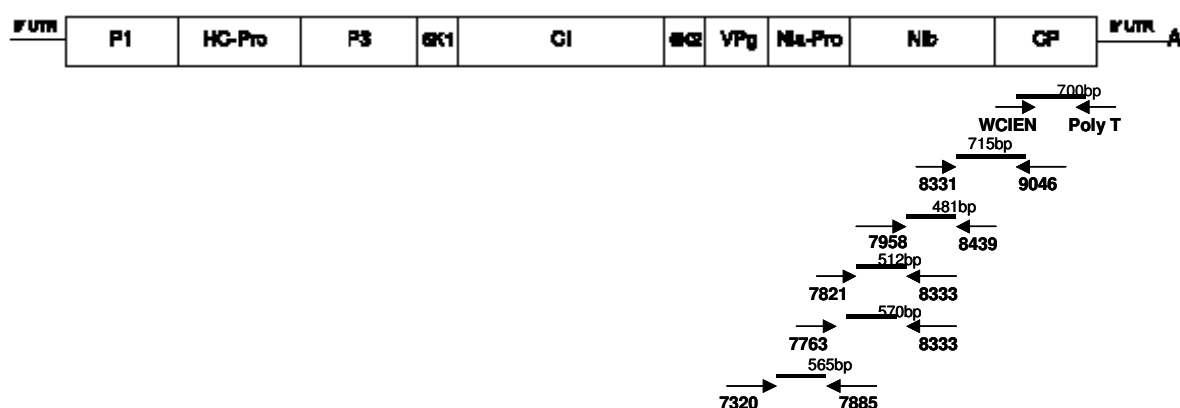


Figura 2. Posição relativa dos oligonucleotídeos desenhados em relação ao genoma do PVY-SN e estratégia para amplificar e sequenciar o genoma parcial do isolado de BiMV-13.

5.4. Caracterização molecular do isolado BiMV-SP

Para o sequenciamento da região terminal 3' do isolado BiMV-SP utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 5.3. Para o sequenciamento do restante do genoma viral utilizou-se a metodologia descrita a seguir.

5.4.1. Extração do RNA

Utilizou-se RNA's extraídos pela metodologia descrita no item 5.3.1, pelo kit "Total RNA Purification Kit", da Norgen Biotek Coporation – Canadá e pela metodologia de Bertheau et al. (1998). Pelo kit da Norgen, cinquenta miligramas de tecido de *C. quinoa*, apresentando lesões locais, foram triturados na presença de nitrogênio líquido e em seguida adicionados 600 μ L da solução de lise. Essa solução foi centrifugada por dois minutos à 10.000 *g*. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. Em seguida, mediu-se o volume transferido. A esse volume foi adicionado igual volume de etanol 70%. Agitou-se bem. Foram adicionados 600 μ L do clarificado à colunas contendo resina e em seguida centrifugado à 10.000 *g* por um minuto. Esta etapa foi repetida até que todo o

conteúdo passasse pelas colunas. Adicionou-se então, 400 µL de solução de lavagem seguido de uma centrifugação de um minuto. Repetiu-se a lavagem por duas vezes subsequentes. A coluna foi colocada em microtubo e adicionado 50 µL de tampão de eluição. Centrifugou-se por dois minutos à 2.000 g e por um minuto à 14.000 g. O RNA foi armazenado em ultra freezer à -80 °C.

Pelo método de Bertheau et al. (1998), as amostras foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS – Tween contendo PVP K25 a 2% (p/v) e Na- DIECA 20 mM. Posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 13.000 g em tubos de microcentrífuga a 4° C (Centrífuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se 20 µL de SDS 10%. Incubou-se a 55 °C por 15 minutos em banho-maria e adicionou-se 100 µL de solução de acetato de potássio a 3 M, agitando-se bem. Seguiu-se incubação no gelo por 5 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13.000 g (4 °C), transferindo-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 700 µL de NaI 6 M e 5 µL de uma solução contendo silício, previamente agitada para que o silício fosse ressuspenso. Agitou-se bem e manteve-se a solução por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por 1 minuto a 5.000 g. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o “pellet” duas vezes com 500 µL de solução de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto), seguida de centrifugação por 1 minuto a 5.000 g para cada lavagem. Posteriormente secou-se o “pellet” a vácuo (Speed Vaccum Eppendorf Concentrator 5301) e ressuspenso-se o RNA em 400 µL de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55 °C em banho-maria. Seguiu-se centrifugação por 5 minutos a 13.000 g. O sobrenadante (300 µL) foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20 °C.

5.4.2. Reação de Transcrição Reversa (RT) e PCR

A RT foi realizada de acordo com o descrito no item 5.3.2., porém com algumas modificações em relação ao oligonucleotídeo utilizado, conforme a região pretendida para amplificação. Inicialmente foram utilizados os oligonucleotídeos degenerados CIFor/CIRev e HPFor/HPRev, descritos por Ha et al. (2008) que amplificam respectivamente um fragmento correspondente a região da CI e outro fragmento correspondente a região da

HC-Pro dos vírus pertencentes ao gênero *Potyvirus*. Foi também utilizado o oligonucleotídeo 7587sens descrito por Zheng et al. (2008) para a região da N1b. Através da amplificação e sequenciamento destes fragmentos, foram desenhados novos oligonucleotídeos senso e antissenso (Tabela 4 e Figura 3).

Utilizou-se para a reação de PCR a enzima Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen), conforme item 5.3.3. Cada reação de PCR consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, 39 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, temperaturas de anelamento entre 40 e 60 °C por 1 minuto e extensão a 68 °C por 1 a 6 minutos, seguido de extensão final por 10 minutos a 68 °C. As temperaturas de anelamento e tempos de extensão da reação de PCR foram selecionadas de acordo com o T_m (Temperatura de Melting) de cada oligonucleotídeo e do tamanho do fragmento amplificado, respectivamente, conforme descrito na Tabela 4.

A reação de PCR para os pares de oligonucleotídeos CIFor/CIRev e HPFor/HPRev foi realizada de acordo com a descrita por Ha et al. (2008), 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 40 °C por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto, seguido de extensão final a 68 °C por 5 minutos.

Foram retirados 5 µl da reação para análise no gel de agarose (0,9%) corado com brometo de etídio.

5.4.3. Amplificação da região 5' terminal

Para tentativas de amplificação da região 5' terminal foi utilizado o kit *Smart Race cDNA Amplification* (Clontech), com algumas modificações no protocolo original. Este kit integra o *BD Marathon cDNA Amplification Kit* com o *BD SMART (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript)* para síntese de cDNA. A tecnologia BD SMART elimina a necessidade de ligar adaptador e pode-se utilizar a fita simples de cDNA diretamente em RACE PCR.

5.4.3.1 Síntese de cDNA

Para a reação de transcriptase reversa foi utilizada a enzima *MMLV* RT (Promega) que age sobre as regiões terminais no RNA utilizado como molde, com uma atividade transferase terminal, adicionando de 3-5 resíduos (predominantemente dC) na região 3' terminal do cDNA fita simples. Com isto, o oligo *SMART II A* que possui resíduos dG na sua extremidade 3', foi adicionado à reação e anelado a extremidade rica em resíduos dC acrescentados pela enzima, criando assim, uma extensão do molde para a RT. A reação terminou com a formação de uma cópia completa do RNA original, sintetizado com uma seqüência adicional do oligo *SMART II A*, utilizada posteriormente para a reação de PCR (RACE).

A reação foi realizada com 3 µL de RNA total extraído conforme o ítem 5.4.1, 1 µL do oligonucleotídeo 5' CDS primer e 1 µL do oligonucleotídeo *SMART II A*. Incubou-se a 70 °C por 2 minutos e posteriormente no gelo por 2 minutos. Após isso adicionou-se 2 µL de 5x First Strand buffer, 2 mM de DTT, 1 mM de dNTP mix (10 mM) e 1 µL da enzima *MMLV* RT (Promega). Incubou-se a 42 °C por 90 minutos, sendo que posteriormente a reação foi diluída em 20 µL de Buffer Tricina-EDTA e aquecida a 72 °C por 7 minutos.

5.4.3.2 RACE PCR

A amplificação da região 5' terminal do genoma foi realizada utilizando-se o oligonucleotídeo UPM (*Universal Primer Mix*), que reconhece a seqüência BD SMART em conjunto com oligonucleotídeos específicos desenhados sentido antissenso, na região codificadora da HC-Pro, denominado *GSP1* (*gene specific primer*). Foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen).

Utilizou-se 2,5 µL do cDNA previamente produzido, 1 µL do oligonucleotídeo *GSP1* a 10 µM, 5 µL do oligonucleotídeo UPM (10x), 5 µL de 10x Hi-Fi buffer, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgSO₄, 2,5 unidades da enzima Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen) e água DEPC para completar o volume de 50 µL.

A reação utilizando-se como *GSP1* os oligonucleotídeos 1849ant, RACE BIMV1 e RACE BIMV2 foi realizada em 5 ciclos de 94 °C por 30 segundos e 68 °C

por 3 minutos, 5 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 66 °C por 30 segundos e 68 °C por 3 minutos e 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 63 °C por 30 segundos e 68 °C por 3 minutos.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do genoma do BiMV-SP

| Primer | Temperatura de melting (°C) | Seqüência (5' para 3') ² |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| CIFOR | 43,2 | GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC |
| CIREV | 43,4 | ACICCRTTYTCDATDATRRTTIGTIGC |
| HPFOR | 31,5 | TGYGAYAAAYCARYTIGAYIIIAAYG |
| HPREV | 37,3 | GAICCRWAIGARTCIAIIACRTG |
| BIMV 7463ant | 60 | GCCTCTTTGTCTTCGTCCG |
| BIMV 4290ant | 62 | CAACCTCTCTGCCTGGTGG |
| BIMV 4650ant | 50 | TGACAATAGAAGTGTAGC |
| BIMV 1849ant | 52 | CGGGTAAACGTAATTACC |
| BIMV 2096sens | 54 | GTAGCAACAACCTTCGTGC |
| BIMV 2039sens | 60 | GAAAGTTCGTGACATGTGCG |
| BIMV 4243ant | 54 | ACGCTTTGTGATGCAAGC |
| BIMV 1948sens | 56 | GGCAACAGTGGTGAACAG |
| BIMV 1892sens | 58 | GGTACGGCCGTGGAATCT |
| BIMV 4379ant | 62 | CCGTGTTTGATCATGTCCGGC |
| BIMV 4351ant | 60 | CCAGTTCCTTGTGCTTCAAC |
| BIMV 2134sens | 56 | GGAATGGCCATCGCTTA |
| BIMV 4202ant | 64 | CAAACCACGAAATGCCATGGC |
| BIMV 4198sens | 56 | CCAGTGCCATGGCATTTC |
| BIMV 4048ant | 64 | CTTCCCCTCATGCGGAGTGT |
| BIMV 4367sens | 56 | ACTGGTAGCAATGCCGAC |
| 7587sens | 48 | TGYGTNGAYGAYTYAAYAA |
| RACE BIMV1 | 70 | GCATGATACTCTTTTTGGCCCC |
| RACE BIMV2 | 74 | GGATAACAATGTTGATTCCACGGCCG |
| BIMV 882sens | 56 | GGYGATAGTGGAGTCATCT |

¹ **sens:** polaridade senso **ant:** polaridade anti-senso. ² **Y:** C/T **R:**G/A **N:** A/T/C/G **W:**A/T **V:**A/C/G **S:**C/G **D:**A/G/T **I:** Inosina.

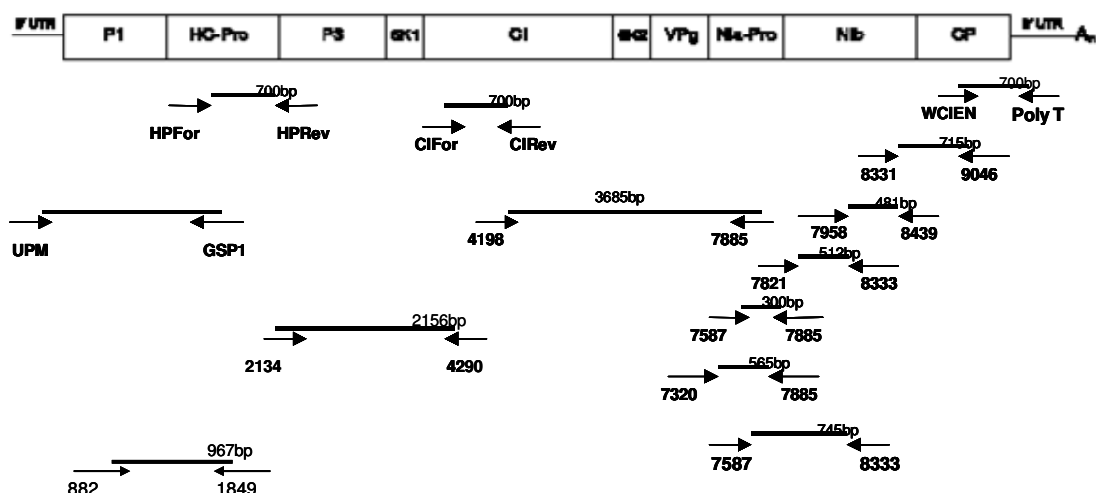


Figura 3. Posição relativa dos oligonucleotídeos desenhados em relação ao genoma do PVY-SN e estratégia para amplificar e sequenciar o genoma parcial do isolado de BiMV-SP.

5.5. Levantamento da ocorrência de BiMV em três regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo

Foram coletadas folhas de alface (*Lactuca sativa*), picão-preto (*Bidens pilosa*), fazendeiro (*Galinsoga parviflora*), espinafre (*Spinacea oleracea*), mostarda-chinesa (*Brassica juncea*), coentro (*Coriandrum sativum*), almeirão (*Cichorium intybus*), *C. quinoa*, e falsa-serralha (*Emilia sonchifolia*) a partir de plantas exibindo sintomas de mosaico. Os locais de amostragem foram produtores comerciais situados nas regiões de Mogi das Cruzes, Mogi Mirim, Campinas e Bauru, e a época de amostragem, durante o outono, inverno, primavera e verão (Tabela 5).

Após a coleta as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao Laboratório de Virologia, localizado no Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, em Botucatu, onde se realizaram as análises laboratoriais e os experimentos. As amostras foram preservadas pelo método de dessecamento, cortando as folhas com sintomas em tiras finas e colocando-as em frasco na presença de cloreto de cálcio anidro (BOS, 1977).

As amostras coletadas no outono de 2008 foram diagnosticadas através de PTA-ELISA e as demais amostras através de RT-PCR.

Tabela 5. Número de plantas coletadas, propriedade, município, época de coleta e o hospedeiro analisado.

| Número de amostras | Propriedade | Município | Época | Hospedeira e cultivar |
|--------------------|--------------------------|------------------|----------|-----------------------------|
| 18 | Seiti Sato | Bauru | Mar/08 | Alface Elisa |
| 12 | Seiti Sato | Bauru | Mar/08 | Alface Lucy Brown |
| 5 | Seiti Sato | Bauru | Mar/08 | Alface Mimosa |
| 2 | Nilson | Lençóis Paulista | Mar/08 | Alface Americana |
| 2 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Abr/08 | Alface Mimosa |
| 7 | Márcio do Espírito Santo | Campinas | Abr/08 | Alface Americana |
| 3 | Márcio do Espírito Santo | Campinas | Abr/08 | Alface Mimosa |
| 3 | Márcio do Espírito Santo | Campinas | Abr/08 | Alface Bruna R |
| 2 | Márcio do Espírito Santo | Campinas | Abr/08 | Alface Lisa |
| 2 | Denílson Sedamo | Campinas | Abr/08 | Alface Americana |
| 3 | Denílson Sedamo | Campinas | Abr/08 | Alface Lisa |
| 2 | Denílson Sedamo | Campinas | Abr/08 | Alface Crespa |
| 9 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Mai/08 | Alface Mimosa |
| 4 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Mai/08 | Alface Amanda |
| 3 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Mai/08 | Alface Elisa |
| 4 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Mai/08 | Alface Romana |
| 3 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Mai/08 | Alface Mimosa |
| 19 | Hiroshi Shintate | Biritiba-Mirim | Mai/08 | Alface Lisa |
| 4 | Hiroshi Shintate | Biritiba-Mirim | Mai/08 | Alface Mimosa |
| 8 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Set/08 | Alface Mimosa |
| 4 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Set/08 | Alface Elisa |
| 1 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Set/08 | Espinafre |
| 1 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Set/08 | Mostarda chinesa |
| 3 | Mário Okuyama | Mogi das Cruzes | Set/08 | Alface Elisa |
| 2 | Mário Okuyama | Mogi das Cruzes | Set/08 | Alface Veneranda |
| 7 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Set/08 | Alface Elisa |
| 8 | Hiroshi Shintate | Biritiba-Mirim | Set/08 | Alface Crespa |
| 13 | Seiti Sato | Bauru | Out/08 | Alface Elisa |
| 8 | Seiti Sato | Bauru | Out/08 | Alface Mimosa |
| 6 | Seiti Sato | Bauru | Out/08 | Alface Americana |
| 10 | Seiti Sato | Bauru | Out/08 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 5 | Amauri Gonçalves | Holambra | Out/08 | Alface Americana |
| 1 | Amauri Gonçalves | Holambra | Out/08 | Alface Romana |
| 7 | Júlio Marubaiashi | Mogi Mirim | Out/08 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 2 | Júlio Marubaiashi | Conchal | Out/08 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 7 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Nov/08 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 13 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Nov/08 | Alface Vanda |
| 1 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Nov/08 | Alface Mimosa |
| 6 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Nov/08 | Alface Ceres |
| 1 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Nov/08 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 14 | Marcio Motta | Campinas | Nov/08 | Alface Vanda |
| 3 | Marcio Motta | Campinas | Nov/08 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 3 | Flávio dos Santos | Campinas | Nov/08 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 8 | Flávio dos Santos | Campinas | Nov/08 | Alface Mimosa |
| 2 | Flávio dos Santos | Campinas | Nov/08 | Alface Lucy Brown |
| 1 | Flávio dos Santos | Campinas | Nov/08 | Coentro |
| 2 | Marcio dos Santos | Campinas | Abril/09 | Alface Mimosa |
| 2 | Marcio dos Santos | Campinas | Abril/09 | Alface Crespa |

(Continuação)

| Número de Plantas | Propriedade | Município | Época | Hospedeira e cultivar |
|-------------------|-------------------|-----------------|----------|-----------------------------|
| 1 | Marcio dos Santos | Campinas | Abril/09 | Alface Americana |
| 1 | Marcio dos Santos | Campinas | Abril/09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 4 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Abril/09 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 13 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Abril/09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 4 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Abril/09 | Alface Crespa |
| 1 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Abril/09 | Alface Mimosa |
| 2 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Abril/09 | Alface Americana |
| 1 | Marcio Motta | Campinas | Abril/09 | Alface Lisa |
| 3 | Marcio Motta | Campinas | Abril/09 | Alface Mimosa |
| 2 | Marcio Motta | Campinas | Abril/09 | Alface Crespa |
| 1 | Marcio Motta | Campinas | Abril/09 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 9 | Marcio Motta | Campinas | Abril/09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 1 | Seiti Sato | Bauru | Maio/09 | Alface Crespa |
| 3 | Seiti Sato | Bauru | Maio/09 | Alface Lisa |
| 3 | Seiti Sato | Bauru | Maio/09 | <i>C. quinoa</i> |
| 6 | Seiti Sato | Bauru | Maio/09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 1 | Seiti Sato | Bauru | Maio/09 | Almeirão |
| 4 | Seiti Sato | Bauru | Maio/09 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 8 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Junho/09 | Alface Mimosa |
| 4 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Junho/09 | Alface Lisa |
| 6 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Junho/09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 2 | Luis Yano | Mogi das Cruzes | Junho/09 | Mostarda |
| 5 | Hiroshi Shintate | Biritiba-Mirim | Junho/09 | Alface Americana |
| 4 | Hiroshi Shintate | Biritiba-Mirim | Junho/09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 1 | Hiroshi Shintate | Biritiba-Mirim | Junho/09 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 1 | Hiroshi Shintate | Biritiba-Mirim | Junho/09 | Mostarda |
| 4 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Junho/09 | Alface Mimosa |
| 4 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Junho/09 | Alface Lisa |
| 4 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Junho/09 | Alface Crespa |
| 5 | Edson Yamamoto | Biritiba-Mirim | Junho/09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 8 | Seiti Sato | Bauru | Set./09 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 13 | Seiti Sato | Bauru | Set./09 | Alface Americana |
| 9 | Seiti Sato | Bauru | Set./09 | Alface Mimosa |
| 6 | Seiti Sato | Bauru | Set./09 | Alface Lisa |
| 4 | Márcio dos Santos | Campinas | Set./09 | Alface Crespa |
| 3 | Márcio dos Santos | Campinas | Set./09 | Almeirão |
| 3 | Márcio dos Santos | Campinas | Set./09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 3 | Márcio dos Santos | Campinas | Set./09 | Alface Mimosa |
| 5 | Márcio Motta | Campinas | Set./09 | <i>Bidens pilosa</i> |
| 8 | Márcio Motta | Campinas | Set./09 | Alface Crespa |
| 1 | Márcio Motta | Campinas | Set./09 | Alface Lisa |
| 3 | Márcio Motta | Campinas | Set./09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 1 | Márcio Motta | Campinas | Set./09 | Falsa-serralha |
| 1 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Set./09 | Alface Americana |
| 11 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Set./09 | Alface Mimosa |
| 6 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Set./09 | Alface Crespa |
| 1 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Set./09 | <i>Galinsoga parviflora</i> |
| 5 | Kiomy Nakagawa | Campinas | Set./09 | <i>Bidens pilosa</i> |

5.6. Transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia (RT-PCR)

A extração do RNA total das amostras foi realizada de acordo com o método de Bertheau (ítem 5.4.1). Para a amplificação de BiMV por RT-PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos BIMV 8851/9211 descritos na Tabela 3 e Figura 4. Os oligonucleotídeos foram testados em RT-PCR em uma só etapa, utilizando-se o Kit PCR Master Mix (Promega). Para um volume de 25 μ L adicionou-se: 12,5 μ L de PCR Master Mix 2X, 1 mM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade da transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*, marca Promega a 15 unidades/ μ L), 2,5 μ L de RNA e água livre de RNAses para completar o volume de 25 μ L. O ciclo utilizado consistiu em 30 minutos a 42 °C, seguido de 5 minutos à 95 °C, 40 ciclos de 92 °C/20 segundos, 56 °C/40 segundos e 72 °C/60 segundos, finalizando com 72 °C/10 minutos.

As amostras foram testadas também para a presença de LMV e LeMoV, visando verificar a ocorrência de infecções mistas no campo. A reação para LMV foi realizada através dos oligonucleotídeos LMV 9171 (5' GCGTTGATGTCGTCATCYTT 3') e LMV 8894 (5'CCGTACATAGCIGARTGTGCT 3'), que amplificam um fragmento de 278 bp, descritos por Revers et al. (1997). Para a reação de PCR foram utilizados 5 μ L de RNA total; 2,5 μ L de tampão da reação; 3,5 mM de MgCl₂; 0,17% de Triton X-100; 1 mM de cada oligonucleotídeo; 0,25 mM de dNTPs; 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase; 0,75 U da transcriptase reversa do AMV e quantidade suficiente de água DEPC para completar 25 μ L. A condição da reação de RT-PCR foi de 42 °C por 15 minutos para transcrição reversa; desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos; 40 ciclos de anelamento a 54 °C por 20 segundos; 40 ciclos de polimerização a 72 °C por 40 segundos e polimerização final por 10 minutos a 72 °C.

Para LeMoV foi realizada através dos oligonucleotídeos Lmo3 (5' ACATGAGCACTAGTGAGG 3') e Lmo4 (5' AGATAGAGCCGTCTGGCG 3'), que amplificam um fragmento de 300 bp, descritos por Jadão (2004). Para a reação de PCR foram utilizados 5 μ L de RNA total; 2,5 μ L de tampão da reação; 3,5 mM de MgCl₂; 0,17% de Triton X-100; 1 mM de cada oligonucleotídeo; 0,25 mM de dNTPs; 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase; 0,75 U da transcriptase reversa do AMV e quantidade suficiente de água DEPC para completar 25 μ L. O ciclo utilizado na reação consistiu de 30 minutos a 42 °C, 3 minutos

a 95 °C, 35 ciclos de 95 °C/30segundos, anelamento de 52 °C/ 30segundos e 72 °C/ 30segundos, e um tempo final de elongação de 72 °C durante 10 minutos.

O produto da RT-PCR (5 µL), juntamente com o marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen) foi visualizado em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico; 0,02 mM EDTA pH 8,3) corado com 0,1 µL/mL de brometo de etídio. Controles positivo, negativo e branco (reação de PCR com água substituindo o RNA molde) foram incluídos na extração e nas reações de PCR a fim de validar e confirmar a especificidade do método utilizado.

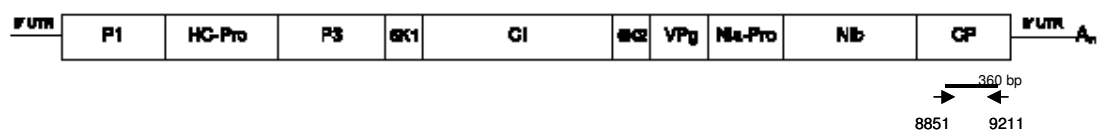


Figura 4. Oligonucleotídeos específicos para diagnóstico de BiMV e sua posição relativa no genoma do PVY-SN.

5.7. Preparo de células competentes de *Escherichia coli*

Para etapa de clonagem foram preparadas células competentes de *E. coli* estirpe XL1 para serem eletroporadas com o plasmídeo contendo o inserto. Para isto foi preparada em meio SOB (sem Magnésio) uma pré-cultura de 5 mL de células de *E. coli* XL1 preservadas a -80 °C. Esta pré-cultura foi deixada durante a noite a 37 °C sob agitação constante. No dia posterior, a pré-cultura foi utilizada para inocular 500 mL de meio SOB-Mg e incubada a 37 °C sob agitação até atingir a densidade ótica de 0,75 OD₅₅₀. A suspensão foi coletada em frascos de centrifuga previamente resfriados e centrifugada a 2.600 g por 15 minutos a 4 °C. Em seguida o “pellet” foi ressuscitado em glicerol 10% (gelado) e centrifugado novamente a 2.600 g por 15 minutos a 4 °C. Mais uma etapa de ressuspensão em glicerol 10% foi realizada e em seguida o excesso de líquido foi retirado dos tubos de centrifuga e o “pellet” ressuscitado com algumas gotas de glicerol 10% e a OD₅₅₀ ajustada a

200-250 unidades/mL. Alíquotas de 80 μ L foram repartidas em tubos e armazenadas a -80 °C até o momento de serem eletroporadas.

5.8. Clonagem e seqüenciamento

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM-T (Promega), sendo que para isto o DNA foi anteriormente purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega). A reação de ligação foi realizada conforme descrição do fabricante para o vetor pGEM-T Easy (Promega) utilizando-se 3 μ L de inserto e incubada por 2 horas a 16 °C.

A transformação foi realizada por eletroporação, utilizando 40 μ L da célula competente *E. coli* XL1, 40 μ L de glicerol 10% e 2 μ L de reação de ligação. Foram então adicionados 600 μ L de meio SOC (triptona, extrato de levedura, NaCl, KCl, MgCl₂ e glicose) ao tubo e levado para incubação por 1 hora a 37 °C, sob agitação. Em placas de Petri com o meio LB (peptona, extrato de levedura e NaCl) + ampicilina (100 μ g/mL), foram espalhados 50 μ L de X-gal e 50 μ L de IPTG, deixando-se secar, e transferindo-se para a placa 100 μ L de célula competente transformada. Estas placas foram incubadas a 37 °C durante 16 horas.

Cada colônia de bactérias transformadas (brancas), foi repicada em tubos contendo meio LB + ampicilina e mantidas no agitador, para crescimento por 12 a 18 horas, a 37 °C e 300 rpm. Após o crescimento as bactérias foram colocadas em microtubos e precipitadas, centrifugando-as por 2 minutos a 13.000 g em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado em seguida. Posteriormente foi adicionado 100 μ L de solução Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0, Glicose 1 M, misturando-se até homogeneizar e mantendo-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 200 μ L de solução NaOH 0,2 N e SDS 1% e agitou-se 15 vezes por inversão, mantendo-se por 5 minutos no gelo. Após adicionou-se 150 μ L de solução Acetato de Potássio 3 M/5 M pH 4,8, agitando-se 10 vezes por inversão e mantendo por 5 minutos no gelo. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, transferindo-se o sobrenadante para novos microtubos.

Adicionou-se 300 μL de isopropanol, misturando-se bem e centrifugando a 12000 g por 5 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 μL de etanol 70% ao “pellet”, centrifugando-se por 1 minuto a 12.000 g a 4 $^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” secado à vácuo. Após a secagem este foi ressuspendido em 20 μL de água ultrapura autoclavada contendo RNase.

Após a extração dos plasmídios realizou-se digestão com enzima de restrição *Eco RI*. Na reação de clivagem foram utilizados 6,7 μL de água; 1 μL de tampão 10 X (React 3); 2 μL do miniprep; 0,3 μL de *Eco RI* (1U/mL), totalizando dessa forma 10 μL de reação. Essa reação foi incubada entre uma a duas horas à 37 $^{\circ}\text{C}$ e a presença ou ausência do inserto verificado através de eletroforese em gel de agarose a 0,9%. A qualidade do DNA, o tamanho do fragmento e a quantificação foram estimados em gel de agarose utilizando-se o marcador de comprimento 1 Kb DNA Ladder e o marcador de massa High Mass Ladder (Invitrogen) ou através de espectrofotômetro de baixo volume marca ACTGene ASP-2680.

Quando os produtos de PCR apresentaram uma banda nítida optou-se pelo sequenciamento direto, realizando-se um novo PCR com volume total de 100 μL , com mesmos reagentes e nas mesmas condições do item anterior, e a seguir purificação com kits comerciais descritos anteriormente. No caso dos plasmídios recombinantes estes foram seqüenciados com oligonucleotídeos universais (T7, SP6), cuja seqüência está presente no vetor.

Os fragmentos de PCR ou plasmídios foram seqüenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP-SP) ou enviados para a empresa Macrogen (Seoul, Korea). As seqüências obtidas a partir do plasmídio recombinante ou produtos de PCR foram analisadas utilizando-se os programas BLAST n (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para comparação com demais seqüências disponíveis no Genbank (Tabela 6). As análises filogenéticas foram realizadas com a versão 3.1 do programa Mega (Kumar et al., 2004).

Tabela 6. Lista de isolados de potyvirus utilizados para análise filogenética. A origem geográfica e número de acesso no GenBank do gene codificador para a proteína capsidial estão indicados.

| Vírus | Isolado | Localidade | Número de Acesso |
|---|---------------|------------|------------------|
| <i>Sunflower chlorotic mottle virus</i> (SCMoV) | SCMoV-AR | Argentina | AF255677 |
| | SCMoV-df | Argentina | EU606023 |
| | SCMoV-CRS | Argentina | EU418771 |
| <i>Potato virus Y</i> (PVY) | PVY LYE84.2 | Espanha | AJ439545 |
| | PVY-SN | França | AJ439544 |
| <i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV) | PepYMV | Brasil | AF348610 |
| <i>Pepper severe mosaic virus</i> (PepSMV) | PepSMV | Argentina | X66027 |
| Bidens mottle virus (BiMoV) | BiMoV-gc | Taiwan | AB491763 |
| | BiMoV-lettuce | Taiwan | AB491764 |
| | BiMoV-ba | E.U.A. | EU078960 |
| <i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV) | LMV-AF199 | Brasil | AJ278854 |
| <i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV) | TuMV | Vietnã | DQ925463 |
| Bidens mosaic virus (BiMV) | BiMV-p | Brasil | AY960150 |
| | BiMV-b | Brasil | AY960151 |

5.9. Purificação do BiMV para imunização de coelhos

Para purificação do isolado BiMV-13 foi utilizado o protocolo descrito por Nagata et al. (1995) com algumas modificações. Folhas de *C. quinoa* infectadas foram homogeneizadas em tampão borato pH 8.4 na proporção 1:2 (p/v), contendo EDTA e 2-mercaptoetanol. Após filtrar o extrato em gaze este foi centrifugado a 5.000 g por 15 minutos. Triton X-100 foi adicionado ao sobrenadante para concentração final 2% e agitado levemente por 1,5 horas. Posteriormente PEG-6000 foi adicionado para concentração final de 6% e NaCl para concentração final 0,5%, seguido de agitação por 1,5 horas. Esta solução foi centrifugada a 5000 g por 20 minutos e o “pellet” foi coletado e dissolvido em tampão Borato-Uréia (ácido bórico 50 mM, Uréia 0,5 M, EDTA 6 mM, 2-Mercaptoetanol 0,1%, pH 8.3). Depois de uma

centrifugação de um minuto a 6.000 g, o sobrenadante foi centrifugado a 63.000 g por 100 minutos em almofada de sacarose 20%.

Posteriormente se realizou o gradiente isopícnico em cloreto de cério (CsCl) a 15%, tendo sido o semi-purificado viral colocado sobre um colchão (3 mL) também de CsCl a 53% (p/p) dissolvido em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0. A banda resultante foi retirada e submetida a diálise em tampão fosfato 0,001 M pH 7,0 conforme descrito por (MARINHO & KITAJIMA, 1989).

5.9.1. Espectrofotometria

Foram retirados 2 µL da solução viral purificada para a leitura de absorbância em espectrofotômetro (ACTGene ASP-2680). A absorbância foi determinada para os comprimentos de onda entre 220 e 340 nm e a concentração viral estimada através da fórmula: $\text{Concentração} = \text{Absorbância}_{260\text{nm}} \times \text{diluição} / E_{0.1\% \text{cm}, 260}$ onde $E_{0.1\% \text{cm}, 260}$ = coeficiente de extinção. Utilizou-se o coeficiente de extinção do PVY igual a 2,4.

5.9.2 . Teste de infectividade

O teste de infectividade foi realizado para monitoramento quanto à presença de vírus, tanto com as soluções semi-purificadas (antes de submetidas à gradiente) e purificadas (após gradiente) quanto para as soluções mini-purificadas (protocolo Lane, 1992). Plantas de *C. quinoa* foram inoculadas com as soluções virais e as plantas analisadas periodicamente para a presença de sintomas.

5.9.3. Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica foi empregada para a observação das partículas virais em folhas de hospedeiras com sintomas de infecção viral, e também para monitorar o processo de purificação do BiMV. Para análise das amostras foi utilizada a técnica de “leaf dip” descrita por Kitajima (1965).

O tecido vegetal foi macerado em tampão fosfato 0,05 M contendo 0,01 M de sulfito de sódio, pH 7,0 e utilizou-se uma gota da suspensão (seja do macerado ou

do purificado do viral) que foi colocada sobre parafilme. Sobre a gota foi depositada uma grade de cobre (300 mesh) previamente coberta por uma película fina de formvar e tratada com carbono. Após 5 minutos, a grade foi lavada em água destilada, três vezes consecutivas, e contrastada com solução de acetato de uranila a 3% durante 1 minuto. Preparações purificadas também foram contrastadas com solução de acetato de uranila a 3% durante 1 minuto. As observações foram realizadas no Microscópio Eletrônico Phyllips CM 100 do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP-Botucatu.

5.10. Gel de Poliacrilamida para estimativa do Peso Molecular da Proteína Capsidial

O peso molecular da proteína capsidial (CP) do vírus foi estimado através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. As proteínas dos purificados virais foram extraídas em tampão de dissociação (Tris 0,5 M pH 6,8, SDS 3,8%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 19%) na proporção de 1:1 (15 µL de purificado viral para 15 µL do tampão). As amostras foram incubadas em água fervente por 5 minutos para dissociação completa das proteínas, seguida de incubação no gelo por 5 minutos.

Estas foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel de separação foi composto por acrilamida 12,5% , água destilada, Tris 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05% e TEMED (3,5 µL). O gel de empilhamento foi composto por acrilamida 4%, água destilada, Tris 1,0 M, pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,076% e TEMED (3,5 µL). Cada canaleta do gel recebeu 10 µL da amostra a ser analisada. Foi utilizado marcador com peso molecular na faixa de 6.0 a 181.8 kDa (BenchMarktm Pré - Stained Protein Ladder, Invitrogen). A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 90 volts, 60 mA, até a linha frontal do azul de bromofenol atingir o gel separador, em seguida a voltagem foi elevada para 120 volts. A corrida foi interrompida quando as amostras chegaram na base do gel.

O gel foi corado com solução contendo Comassie Brilliant Blue R 250 (0,1 g), álcool metílico (45 mL), ácido acético glacial (10 mL) e água destilada (45 mL), por 30 minutos, em agitação orbital. Em seguida, foi descorado por duas horas com a solução descorante que continha álcool metílico (400 mL), ácido acético glacial (100 mL) e água destilada (1.500 mL).

5.11. Obtenção do Anti-soro

Para a produção de anticorpos policlonais para o isolado BiMV-13 foram utilizadas duas coelhas da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 4 meses de idade, seguindo a metodologia descrita por Bezerra et al. (1995), com modificações. Para a primeira injeção o purificado viral foi emulsificado a 1:1 (v/v) com adjuvante completo de Freund (marca Sigma). Para as demais injeções posteriores o purificado viral foi emulsificado a 1:1 (v/v) no adjuvante incompleto de Freund (marca Sigma). Foram administradas no total cinco injeções (0,2 mg de vírus) intramusculares no coelho, com intervalo semanal, para um total de 1 mg de vírus.

O sangue foi coletado 10 dias após a última injeção através de cortes na veia marginal da orelha do coelho. A amostra de sangue foi incubada a 37 °C por 30 minutos, sendo posteriormente coagulada a 4 °C por 12 horas, seguida de uma centrifugação a 3.000 g por 10 minutos, para a obtenção do soro sangüíneo. O soro obtido foi novamente centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e transferido para microtubos (1,5 mL), os quais foram etiquetados e armazenados a -20 °C. Anti-soro de um coelho não imunizado também foi produzido como controle negativo.

Posteriormente foi realizada a purificação da imunoglobulina, adicionando-se 8 mL de água destilada a 2 mL de anti-soro. Acrescentou-se 10 mL de solução saturada de sulfato de amônio, por gotejamento e agitação constante. Deixou-se em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se a 8.000 g por 10 minutos. O precipitado foi coletado e dissolvido em 2 mL de tampão PBS 1X 50%. Realizou-se a diálise por 18 horas, em PBS 1X 50%, trocando-se a solução três vezes, em agitação constante a 4 °C. Centrifugou-se a 3.000 g por 10 minutos e coletou-se o sobrenadante. A concentração foi medida em espectrofotômetro a 280 nm e diluída a 1,4 (1 mg proteína/mL) (ALMEIDA, 2001).

5.12. PTA-ELISA

O teste de “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) do tipo “Plate Trapped Antigen” (PTA) descrito por Mowat e Dawson (1987), com algumas

modificações, foi realizado para avaliação do anti-soro obtido. As amostras foram maceradas em presença do tampão carbonato (0,015 M de Na_2CO_3 , 0,035 M NaHCO_3 , pH 9,6) na diluição 1:20, sendo então aplicados 100 μL de cada amostra, por pocinho na placa de ELISA. Foram utilizados quatro pocinhos por amostra. As amostras foram incubadas por 1,5 h a 37 °C, seguida de três lavagens sucessivas com PBS-Tween (0,015 M KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl, 0,004 M Na_2HPO_4 , 0,003 M KCl, pH 7,4 acrescido de 0,5 mL de Tween 20%). Após as lavagens, 100 μL do anti-soro específico para o BiMV, diluído 1:200 em tampão Tris-HCl pH 7,2 (0,20 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl) foram aplicados em cada pocinho. A placa foi novamente incubada a 37 °C por 1,5 h, sendo posteriormente lavada 3 vezes consecutivas com PBS-Tween. Após, foram aplicados 100 μL /pocinho de Imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina diluída em tampão Tris-HCl pH 7,2 e incubadas por 1,5 horas, seguido de lavagem com tampão PBS Tween. Adicionou-se 100 μL do substrato p-fosfato de nitrofenil (Marca Sigma), diluído em tampão dietanolamida pH 9,8. A placa foi incubada em temperatura ambiente, no escuro e as leituras feitas após uma hora em leitor de ELISA da marca Multiskan Plus (Version 2.03), com filtro de 405 nm. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor de absorbância apresentou-se maior do que três vezes a média de absorbância do controle negativo.

Para a absorção do anti-soro ao tecido de planta sadia (*C. quinoa* sadia) folhas de plantas de *C. quinoa* sadias foram maceradas em tampão 0,2 M Tris-HCl pH 7,2 na proporção 1/10 (p/v). O extrato obtido foi filtrado e acrescentou-se o anti-soro, na diluição 1:10 (anti-soro/extrato de planta).

Foram realizados testes visando estabelecer a melhor diluição de extrato vegetal e anti-soro. Foram testadas as diluições de extrato vegetal 1:10 e 1:20 e do anti-soro 1:100, 1:200 e 1:500. Após a padronização do teste realizou-se a diagnose das amostras coletas durante o outono de 2008.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização biológica dos isolados

Os isolados BiMV 13 e BiMV SP foram eficientemente purificados por monolesionais utilizando-se a hospedeira *C. quinoa*. Os resultados da avaliação de gama de hospedeiros realizados para estes isolados podem ser verificados na Tabela 7. Ambos os isolados foram transmitidos através de inoculação via extrato vegetal tamponado, porém com alta ocorrência de escape. Pode se observar que o isolado BiMV-13 apresenta um círculo de hospedeiros bastante restrito, envolvendo as espécies *C. quinoa* (Figura 5A), *C. amaranthicolor* (Figura 5B), e alface “Trocadero” (Figura 6A), enquanto que para o BiMV-SP verificou-se infecção em *G. globosa* (latente), *N. benthamiana*, *N. occidentalis*, *N. clevelandii*, *Zinnia elegans*, ervilha e girassol, além das hospedeiras citadas anteriormente (Figura 8).

De forma interessante o BiMV-13 mostrou-se sistêmico em *C. quinoa*, enquanto que o BiMV-SP causou somente lesões locais (Figura 5C). Também apresentou maior agressividade em alface do que o isolado BiMV-SP (Figura 6), sendo escolhido para se testar provável resistência em cultivares de alface. Os resultados para inoculações do isolado BiMV-SP foram confirmados através de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para BiMV (Figura 7).

Tabela 7. Avaliação da gama de hospedeiros do isolado BiMV-13 e BiMV-SP.

| Plantas indicadoras | BiMV-13 | BiMV-SP |
|--|----------------|----------------|
| <i>Amaranthus viridis</i> | — | - |
| <i>Bidens pilosa</i> | - | M |
| <i>Capsicum annum</i> “Magda” | — | - |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> | PCS | LL |
| <i>Chenopodium murale</i> | — | - |
| <i>Chenopodium quinoa</i> | LL e MS | LL |
| <i>Cucurbita pepo</i> | - | - |
| <i>Datura metel</i> | — | - |
| <i>Datura stramonium</i> | - | - |
| <i>Gomphrena globosa</i> | - | -** |
| <i>Helianthus annuus</i> “Catissol 1” | - | M |
| <i>Lactuca sativa</i> “Trocadero” | MS | M |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> “Santa Clara” | - | - |
| <i>Nicandra physaloides</i> | - | - |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | - | MS, Enc |
| <i>Nicotiana clevelandii</i> | - | MS |
| <i>Nicotiana glutinosa</i> | - | - |
| <i>Nicotiana occidentalis</i> | - | MS |
| <i>Nicotiana rustica</i> | - | - |
| <i>Nicotiana tabacum</i> “Havana 425” | - | - |
| <i>Nicotiana tabacum</i> “TNN” | - | - |
| <i>Nicotiana tabacum</i> “Turkish” | - | - |
| <i>Nicotiana tabacum</i> “Xanthii” | - | - |
| <i>Petunia hybrida</i> | - | - |
| <i>Pisum sativum</i> | .* | MS |
| <i>Physalis floridana</i> | - | - |
| <i>Sonchus oleraceus</i> | - | - |
| <i>Zinnia elegans</i> | - | MS |

M: mosqueado; PCS: pontuações cloróticas sistêmicas; LL: lesão local; MS:mosaico sistêmico; LLC: lesão local concêntrica; Enc: encarquilhamento foliar-: sem sintomas, —: não avaliado. * Lesão local após retroinoculação em *C. quinoa*. ** Assintomática, infecção confirmada através de RT-PCR



Figura 5. Sintomas causados pelos isolados BiMV-13 em *Chenopodium quinoa* (A) e *Chenopodium amaranticolor* (B) e BiMV-SP em *C. quinoa* (C).



Figura 6. Sintomas causados pelos isolados BiMV-13 (A) e BiMV-SP (B) em alface cv. Trocadero

Diferentemente dos isolados de BiMV já descritos, o isolado BiMV-13 não foi capaz de infectar *B. pilosa*, girassol, *N. tabacum* TNN e *N. rustica*, enquanto o isolado BiMV-SP não infectou *N. tabacum* TNN e *N. rustica* e foi capaz de infectar sistemicamente *G. globosa*. Rodrigues et al. (1991) também não observaram a transmissão de

um isolado de BiMV proveniente de *Coreopsis lanceolata* para *N. rustica*, *N. glutinosa* e *Z. elegans*.

Também foi verificado um círculo de hospedeiro restrito para os isolados de BiMV estudados por Rodrigues et al. (1991) e por Nagata et al. (1995). A baixa concentração do BiMV nos tecidos da hospedeiras, conforme verificado por Kuhn et al. (1982) pode ajudar a explicar a dificuldade de transmissão do vírus.

Variações na sintomatologia dentro das espécies são aceitáveis se considerarmos a variabilidade natural do hospedeiro e a própria variabilidade do vírus (HASEGAWA, 2006). Alguns isolados de SCMoV são capazes de infectar *B. pilosa* e outros não (DUJOVNY et al., 1998; MARITAN et al., 2004). Da mesma forma, Liao et al. (2009) identificaram um isolado de BiMoV em Taiwan com gama de hospedeiros restrita em relação aos outros isolados de BiMoV, infectando apenas *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *N. benthamiana* e girassol. Neste caso, dois isolados de BiMV, coletados a partir de hospedeiras diferentes e locais diferentes apresentaram grande variação biológica.

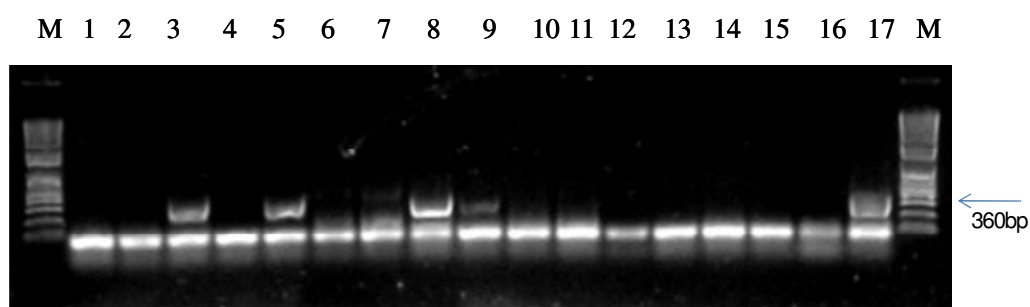


Figura 7. Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos 8851/9211, nas hospedeiras inoculadas com o isolado BiMV-SP. M=Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen). 1 e 2 – *N. tabacum* “Xanthi”, 3 a 5 – *G. globosa*, 6 e 7 – *D. metel*, 8 –Girassol catissol 1, 9 a 11 – alface “Trocadero”, 12 e 13 – *N. tabacum* “Turkish”, 14 a 15 – *N. tabacum* “TNN”. 16- controle negativo, 17 – controle positivo.



Figura 8. Sintomas causados pelo isolado BiMV-SP em *N. benthamiana* (A), girassol (B), *Z. elegans* (C), *N. clevelandii* (D) e *N. occidentalis* (E).

6.2. Avaliação de cultivares comerciais de alface

A avaliação de algumas das principais cultivares de alface comerciais quanto à resistência ao BiMV-13 permitiu concluir que as cultivares hoje utilizadas são na maioria suscetíveis a este vírus (Tabela 8). Os resultados em algumas cultivares foram semelhantes aos obtidos por Hasegawa (2006), principalmente a ocorrência de sintomas no grupo repolhuda lisa (cultivares White Boston e Regina) e ausência de sintomas na cultivar Gisele (grupo folhas crespas). No grupo americana as cultivares Robinson, Lucy Brown e Tainá foram suscetíveis ao isolado BiMV-13. A maior suscetibilidade dos cultivares de alface

ao isolado BiMV-13, em relação ao isolado descrito por Hasegawa (2006) é preocupante, pois os grupos de alface lisa e americana correspondem a 37% do consumo de alface no Estado de São Paulo, segundo o CEAGESP (TRANI et al., 2005).

Tabela 8. Avaliação das principais cultivares de alface comerciais inoculadas com o isolado BiMV-13

| Cultivar | Grupo | Sintomas |
|-----------------|--------------|-----------------|
| Regina | Lisa | MS |
| Verônica | Crespa | MS |
| Robinson | Americana | MS |
| Lucy Brown | Americana | MS |
| Rafaela | Americana | MS |
| Tainá | Americana | MS |
| Gisele | Crespa | - |
| Vera | Crespa | MS |
| Laurel | Americana | MS |
| White Boston | Lisa | MS |

MS: mosaico sistêmico; -: sem sintomas..

6.3. Caracterização molecular dos isolados BiMV-13 e BiMV-SP

Os oligonucleotídeos PolyT/WCIEN amplificaram eficientemente o fragmento de 700 bp na porção da proteína capsidial e 3'UTR, enquanto que os de números 8331sens/9046ant o fragmento de 715 bp, os 7958sens/8439ant o fragmento de 481 bp, os 7821sens/8333 ant o fragmento de 512 bp, os 7763sens/8333ant o fragmento de 570 bp e os 7320sens/7885ant o fragmento de 565 bp, todos na porção codificadora da NlB e da proteína capsidial, tanto dos isolados BiMV-13 e BiMV-SP (Figura 9 e 10).

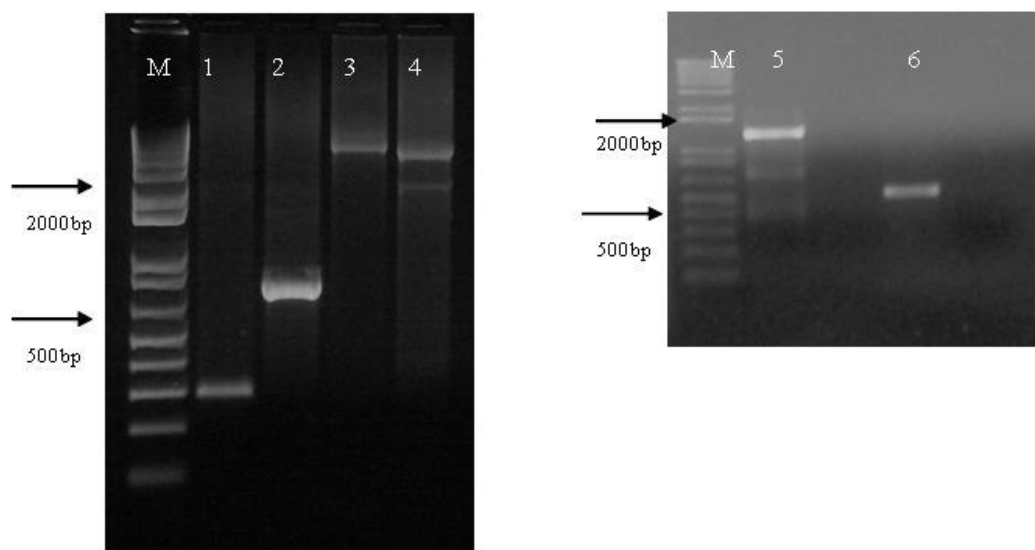


Figura 9 – Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos 7587sens/7885ant(1), 7587sens/8333ant(2), 4198sens/8333ant(3), 4198sens/7885ant(4), 8331sens/PolyT(5), 7821sens/8333ant(6). M = Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen).

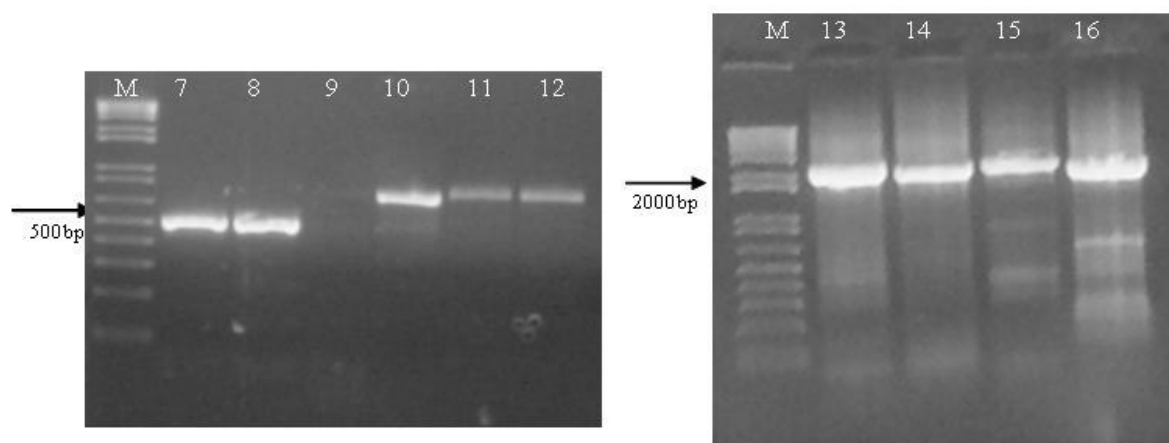


Figura 10 – Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos 7958sens/8439ant (7 e 8), 8331sens/9046ant (9 e 10), PolyT/WCIEN (11 e 12) 1948/4290 (13 e 15) e 2134/4290(14 e 16). M = Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen).

O sequenciamento destas regiões permitiu a obtenção de uma sequência de 2000 bp, compreendendo as regiões 3'UTR, região codificadora da proteína capsidial e parte da região codificadora da Nib tanto do BiMV-13 como BiMV-SP. A proteína capsidial de ambos os isolados apresentou 267 aminoácidos, com o sítio de clivagem VHHQ/V entre a Nib e CP e a presença do motivo DAG. A região terminal 3' não-traduzida (3' UTR) apresentou 253 nucleotídeos. Esses resultados são idênticos aos obtidos pelos isolados de BiMV descritos por Inoue-Nagata et al. (2006).

As sequências de aminoácidos na região da proteína capsidial dos isolados BiMV-13 e BiMV-SP foram comparadas com outros isolados de *Potyvirus* descritos na Tabela 6. Verificou-se que estes isolados apresentaram maior identidade (98%) com os isolados de BiMV provenientes de picão (BiMV-b). O isolado BiMV-13 e o BiMV-SP também apresentaram 98% e 97% de identidade de aminoácidos com o isolado de ervilha (BiMV-p), respectivamente (Tabela 9).

A identidade de aminoácidos nesta região com os isolados de SCMoV variou entre 83 a 84% e com isolados de PVY entre 80 e 82%. Segundo os atuais critérios do ICTV para demarcação de espécies no gênero *Potyvirus*, a identidade de aminoácidos na região da proteína capsidial deve ser inferior a 80% para vírus serem considerados espécies distintas. Baseando-se nisto, SCMoV, PVY e BiMV poderiam ser considerados membros da mesma espécie, como foi proposto por Inoue-Nagata et al. (2006). No entanto, verificam-se diferenças em relação a gama de hospedeiros que estes vírus infectam (DUJOVNY et al., 1998; MARITAN et al., 2004), no sítio de clivagem entre a Nib e CP (VHHQ/G nos isolados de SCMoV analisados e VHHQ/A nos isolados de PVY analisados) e no tamanho da região 3' UTR, sendo que atualmente o SCMoV é considerado uma espécie distinta pelo ICTV.

Verificou-se também identidade de aminoácidos na CP entre 71 a 72% com isolados de BiMoV, indicando se tratarem de espécies distintas, confirmando as análises realizadas por Youssef et al. (2008) com outros isolados de BiMV. A identidade com outros *Potyvirus* que infectam alface, o LMV e o TuMV foi de 65-66% e 62% respectivamente.

Tabela 9 Porcentagens de identidade de nucleotídeos (inferior) e aminoácidos (superior) na região codificadora para a proteína capsidial entre isolados de BiMV e Potyvirus relacionados obtida pelo Programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>).

| | SCMoV -AR | SCMoV df | SCMoV -CRS | PVY- LYE84.2 | PVY- SN | PepYMV | PepSMV | BiMoV- gc | BiMoV- lettuce | BiMoV- ba | LMV- AF199 | TuMV | BiMV-p | BiMV-b | BiMV- I3 | BiMV- -SP |
|-------------------|--------------|-------------|---------------|-----------------|------------|--------|--------|--------------|-------------------|--------------|---------------|------|--------|--------|-------------|--------------|
| SCMoV- AR | - | 95 | 94 | 79 | 78 | 74 | 78 | 70 | 71 | 70 | 63 | 63 | 83 | 83 | 83 | 84 |
| SCMoV-df | 88 | - | 97 | 79 | 79 | 73 | 77 | 70 | 70 | 70 | 63 | 63 | 83 | 83 | 83 | 84 |
| SCMoV- CRS | 87 | 96 | - | 79 | 79 | 74 | 76 | 71 | 71 | 71 | 63 | 64 | 83 | 83 | 83 | 83 |
| PVY LYE84.2 | 76 | 75 | 75 | - | 95 | 78 | 79 | 73 | 73 | 73 | 65 | 62 | 83 | 83 | 82 | 82 |
| PVY-SN | 75 | 76 | 75 | 96 | - | 77 | 80 | 75 | 74 | 74 | 65 | 62 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| PepYMV | 64 | 65 | 71 | 64 | 64 | - | 73 | 72 | 72 | 72 | 64 | 61 | 72 | 73 | 73 | 73 |
| PepSMV | 73 | 73 | 73 | 69 | 75 | 65 | - | 70 | 70 | 70 | 65 | 63 | 78 | 79 | 78 | 79 |
| BiMoV-gc | 69 | 69 | 69 | 64 | 64 | 62 | 64 | - | 99 | 98 | 67 | 61 | 70 | 71 | 71 | 71 |
| BiMoV- lettuce | 70 | 70 | 69 | 64 | 64 | 62 | 64 | 98 | - | 98 | 67 | 61 | 70 | 72 | 72 | 72 |
| BiMoV-ba | 69 | 70 | 69 | 63 | 63 | 64 | 64 | 97 | 97 | - | 67 | 61 | 70 | 71 | 71 | 71 |
| LMV- AF199 | 59 | 57 | 56 | 58 | 58 | 56 | 62 | 58 | 58 | 58 | - | 59 | 66 | 66 | 65 | 66 |
| TuMV | 55 | 61 | 60 | 55 | 55 | 60 | 59 | 53 | 53 | 52 | - | - | 62 | 62 | 62 | 62 |
| BiMV-p | 78 | 79 | 78 | 76 | 74 | 64 | 74 | 70 | 69 | 69 | 59 | 54 | - | 99 | 97 | 98 |
| BiMV-b | 78 | 78 | 78 | 75 | 74 | 64 | 74 | 70 | 69 | 69 | 58 | 55 | 98 | - | 98 | 98 |
| BiMV-I3 | 79 | 79 | 78 | 75 | 75 | 64 | 74 | 70 | 70 | 70 | 58 | 55 | 96 | 96 | - | 97 |
| BiMV-SP | 80 | 79 | 78 | 75 | 73 | 63 | 74 | 70 | 69 | 70 | 58 | 55 | 96 | 96 | 97 | - |

Na análise da identidade de nucleotídeos da região da proteína capsidial, demonstrada também na Tabela 9, verificou-se que os isolados BiMV-13 e BiMV-SP apresentaram maior identidade com outros isolados de BiMV (96%), e com isolados de SCMoV (79 a 80%). A identidade com isolados de PVY ficou entre 73 a 75%. Segundo Adams et al. (2005b), vírus com identidade de nucleotídeos na região da proteína capsidial entre 76 a 77% podem ser considerados membros de espécies diferentes.

A análise filogenética com a sequência de aminoácidos da proteína capsidial mostrou agrupamentos com altos valores de bootstrap para os isolados de BiMV, SCMoV e PVY. Formou-se um subgrupo com mesmo ancestral comum para os isolados de BiMV e SCMoV, sendo este subgrupo inserido num grupo contendo isolados de PVY e *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV) (Figura 11). Inoue-Nagata et al. (2006) também observaram este agrupamento filogenético com isolados destes vírus, utilizando a sequência de nucleotídeos da região codificadora da CP.

A análise da região codificadora para a proteína capsidial não é um critério confiável para demarcação de espécies no gênero *Potyvirus*, conforme demonstrado por Adams et al. (2005b), sendo que na ausência de sequências do genoma completo, a região codificadora para a proteína CI é a que reflete com maior precisão essas informações. Devido a dificuldades encontradas no sequenciamento do isolado BiMV-13, o isolado BiMV-SP foi escolhido para se tentar obter o máximo de informações possível do genoma deste vírus.

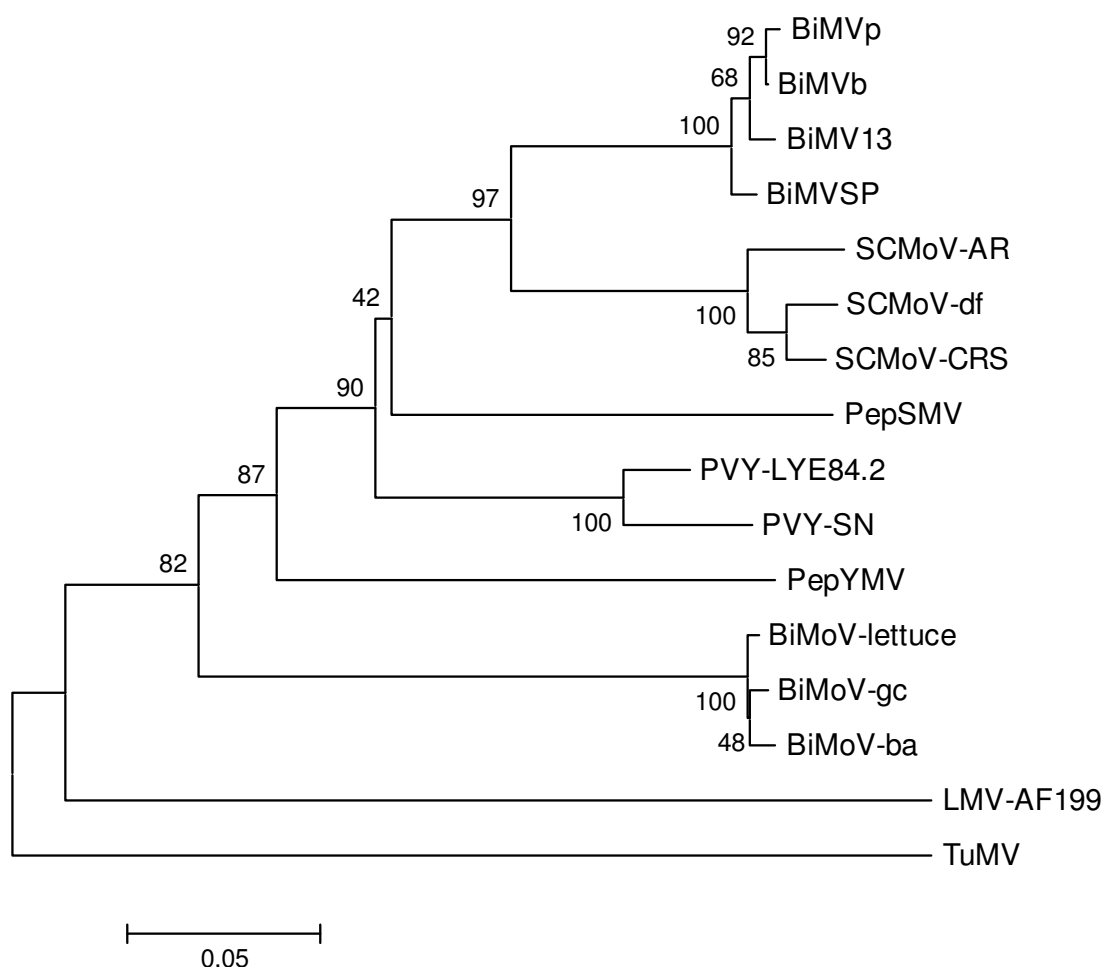


Figura 11. Árvore filogenética da seqüência de aminoácidos correspondente a região codificadora para a proteína capsidial entre os isolados de BiMV e espécies de potyvirus, obtida pelo Programa Mega versão 3.1, utilizando Neighbor-Joining e valor de Bootstrap 2000.

Os oligonucleotídeos 7587sens/7885ant amplificaram eficientemente os fragmentos de 298 bp e os oligonucleotídeos 7587sens/8333ant o fragmento de 746 bp na região da N1b. Os oligonucleotídeos CIFor/CIREv amplificaram eficientemente o fragmento de aproximadamente 700 bp na região da CI e os oligonucleotídeos HPFor/HPRev os

fragmentos de aproximadamente 700 bp na região da HC-Pro (Figura 12). Com o sequenciamento destes fragmentos foi possível desenhar novos oligonucleotídeos para amplificação dos fragmentos entre as regiões da CI e N1b e entre as regiões da CI e HC-Pro.

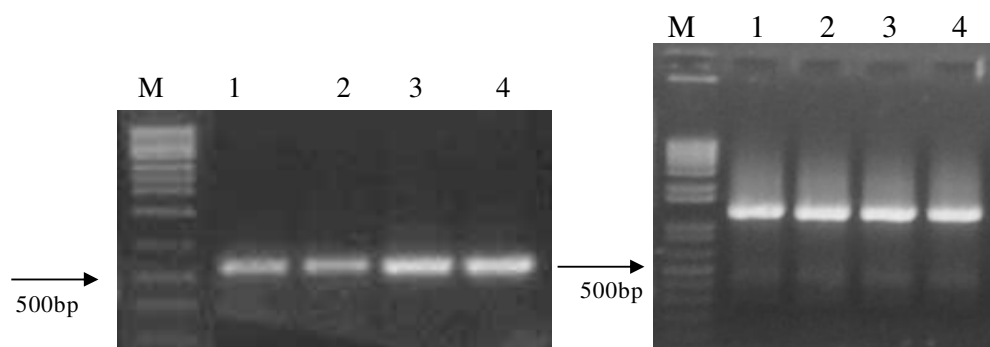


Figura 12. Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos HPFor/HPRev(A) e CIFor/CIRev(B). 1 a 4 cDNA proveniente de *C. quinoa* infectada. M = Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen).

Obteve-se um fragmento de 3687 bp entre a N1b e a CI, através dos oligonucleotídeos 4198sens/7885ant (Figura 9) e um fragmento de 2342 bp (oligonucleotídeos 1948sens/4290ant) e 2156 bp (oligonucleotídeos 2134sens/4290ant) entre a CI e a HC-Pro (Figura 10). Os fragmentos de 3687 bp amplificados pelos oligonucleotídeos 4198sens/7885ant e os fragmentos de 2156 bp amplificados pelos oligonucleotídeos 2134sens/4290ant foram clonados no vetor pGEM-T (Figuras 13 e 14 respectivamente).

O sequenciamento destes fragmentos permitiu a obtenção de uma sequência de nucleotídeos, compreendendo parte da HC-Pro, e as proteínas P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, N1b e CP, totalizando 7945 bp . A tradução desta sequência resultou em um sequência com 2562 aminoácidos. Esta sequência apresentou os aminoácidos conservados descritos para outros *Potyvirus* (DUJOVNY et al., 2000; HA et al., 2008; ZHENG et al., 2008) (apêndice 1).

Os sítios de clivagem entre as proteínas também são similares aos descritos para outros *Potyvirus* (ADAMS et al.2005a; ADAMS & ANTONIW, 2009).

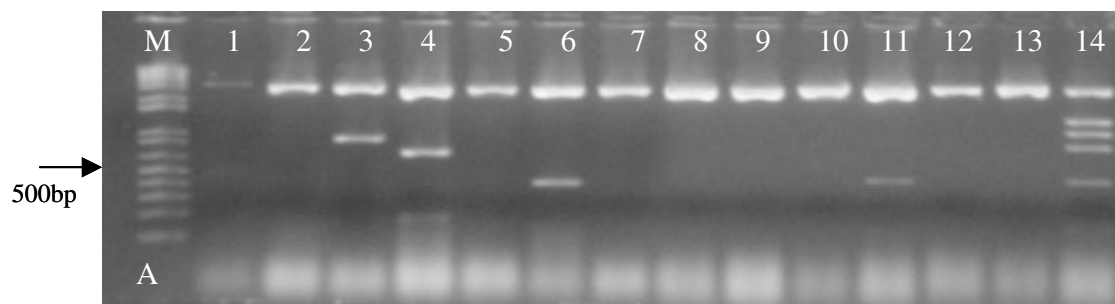


Figura 13– Padrão eletroforético obtido pela restrição enzimática do vetor pGEM-T com a enzima *EcoR* I. Ligação com o produto obtido pelos oligonucleotídeos 4198sens/8333ant. Clone de numero 14 contém o fragmento viral.

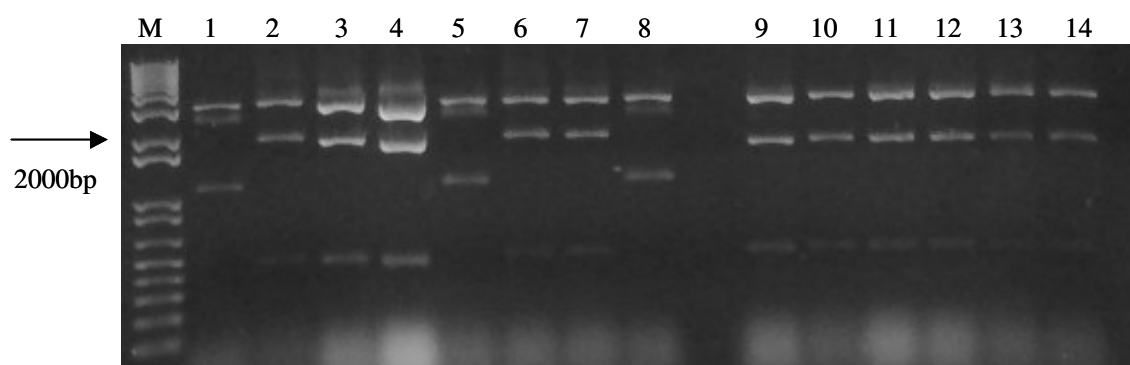


Figura 14–Padrão eletroforético obtido pela restrição enzimática do vetor pGEM-T com a enzima *EcoR* I. Ligação do vetor com o produto obtido pelos oligonucleotídeos 1948sens/4290ant (1 a 8) e 2134sens/4290ant (9 a 14). Clones 9 a 14 possuem o perfil eletroforético correto para presença do genoma viral.

Na comparação da sequência de nucleotídeos obtida (7945 nts) para o isolado BiMV-SP com isolados de PVY e de LMV obteve-se identidade de 70% e 59% respectivamente, representando espécies distintas, segundo os atuais critérios do ICTV (85% de identidade de nucleotídeos no genoma completo). Porém, como a sequência obtida não

compreende todo o genoma viral do BiMV, foi realizada a análise de cada gene isoladamente (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação da porcentagem de identidade de nucleotídeos dos genes sequenciados para o isolado BiMV-SP em comparação com os genes dos isolados PVY-SN e PVY –LYE84.2 e com a identidade proposta (inferior a este valor) para demarcação de espécies na família *Potyviridae*.

| Região do genoma | Identidade com PVY-SN (direita) e PVY-LY (esquerda) | Identidade de nucleotídeos proposta para demarcação de espécies* |
|-------------------------|--|---|
| HC-Pro** | 72-73% | 76% |
| P3 | 63% | 74% |
| CI | 70% | 78,3% |
| VPg | 69% | 76% |
| NIa-Pro | 66% | 76,5% |
| NIb | 73% | 75% |
| CP | 73-75% | 76% |
| 3' UTR | 61% | 76% |

*Segundo Adams et al. (2005b)

**Gene parcialmente sequenciado.

De acordo com a Tabela 10, para todos os genes do BiMV-SP analisados, a identidade de nucleotídeos, comparada com os genes do PVY, foi inferior ao limite proposto para que o BiMV seja considerado uma estirpe de PVY. Silva et al. (2007) analisando a região parcial da HC-Pro de um isolado de BiMV também obteve identidades inferiores à 76%. No gene que codifica a região da CP, verificou-se a maior proximidade com a porcentagem estabelecida como critério de demarcação de espécies, assim como para os genes NIb e HC-Pro. Contudo, no gene da CI, que segundo Adams et al. (2005b) é o que reflete com maior acurácia as informações do genoma completo viral, verificou-se um

distanciamento entre a porcentagem de identidade com isolados de PVY e a porcentagem para demarcação de espécies, bem como nos genes P3, VPg e NIa-Pro e na região 3'UTR.

A maior identidade nos genes CP, NIb e HC-Pro pode estar relacionada com a presença de aminoácidos conservados nestas regiões, sendo vários destes envolvidos em funções vitais do ciclo de vida do vírus, como o motivo DAG (posição entre o aminoácido 6 e 8 após o sítio de clivagem NIb/CP) na CP relacionado à transmissão por afídeos (LOPEZ-MOYA et al., 1999), os aminoácidos GDD (posição entre o aminoácido 656 e 658 após o sítio de clivagem NIa/NIb) na NIb presente em todas RdRp's e PTK, IGN e CCC na HC-Pro, relacionados à transmissão por afídeos, amplificação do RNA e movimento sistêmico, respectivamente (URCUQUI-INCHIMA et al., 2001; HA et al., 2008).

Foram realizadas diversas tentativas de se realizar a amplificação do terminal 5' através de RACE PCR, utilizando-se como *GSP1* os oligonucleotídeos RACEBiMV1, RACEBiMV2 e 1849ant (Figura 15), mas não se obteve sucesso na amplificação deste fragmento. Como observado na Figura 15, para o controle positivo do kit obteve-se uma fraca banda de tamanho em torno de 2,2 Kb como de esperado, indicando que a metodologia empregada está de acordo com o protocolo.

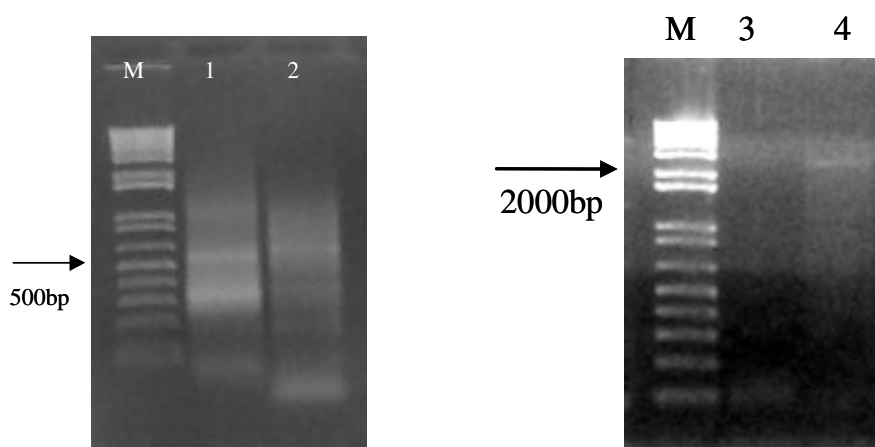


Figura 15. Padrão eletroforético dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos RACEBiMV1(1) e RACEBiMV2(2) e a partir do RNA controle do kit SMART RACE, amplificado pelo oligonucleotídeo 5' Race TFR (3 e 4) M = Marcador de Comprimento 1Kb DNA plus ladder (Invitrogen).

6.4. Purificação do isolado BiMV-13

O método utilizado para purificação se mostrou eficiente, com a formação da banda viral no gradiente de césio (Figura 16) e com as partículas visualizadas através de Microscopia Eletrônica mostrando-se integras ao final do processo de diálise (Figura 17), porém evidenciando baixa concentração viral.

A análise ao espectrofotômetro apresentou um padrão típico de nucleoproteína e revelou uma absorvância de 8,512 à 260 nm e 0,247 à 320 nm (Figura 18) o que resultou em uma concentração de 3,44 mg de partículas virais por mL da solução purificada, sendo o rendimento médio de 50 mg de vírus por quilo de material fresco de *C. quinoa* processada. Rodrigues et al. (1991) relataram a obtenção de 50 mg de vírus/Kg de tecido foliar com o isolado de BiMV proveniente de *Coreopsis lanceolata*. A razão A_{260}/A_{280} foi de 1,80. Os valores estão na faixa já verificada para outros vírus do gênero *Potyvirus*. A inoculação de alíquotas de todas as etapas do processo de purificação e da solução purificada causou sintomas de lesão local em *C. quinoa*, após 7 dias, concluindo-se que as partículas estavam infectivas.

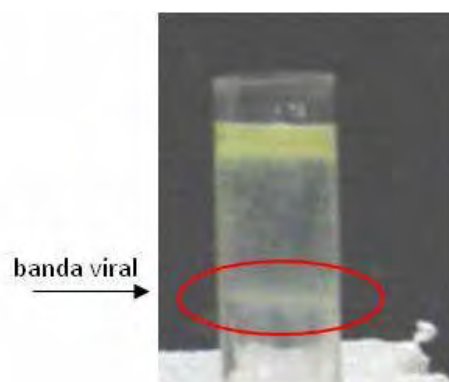


Figura 16. Banda viral resultante após o gradiente isopícnico de cloreto de césio

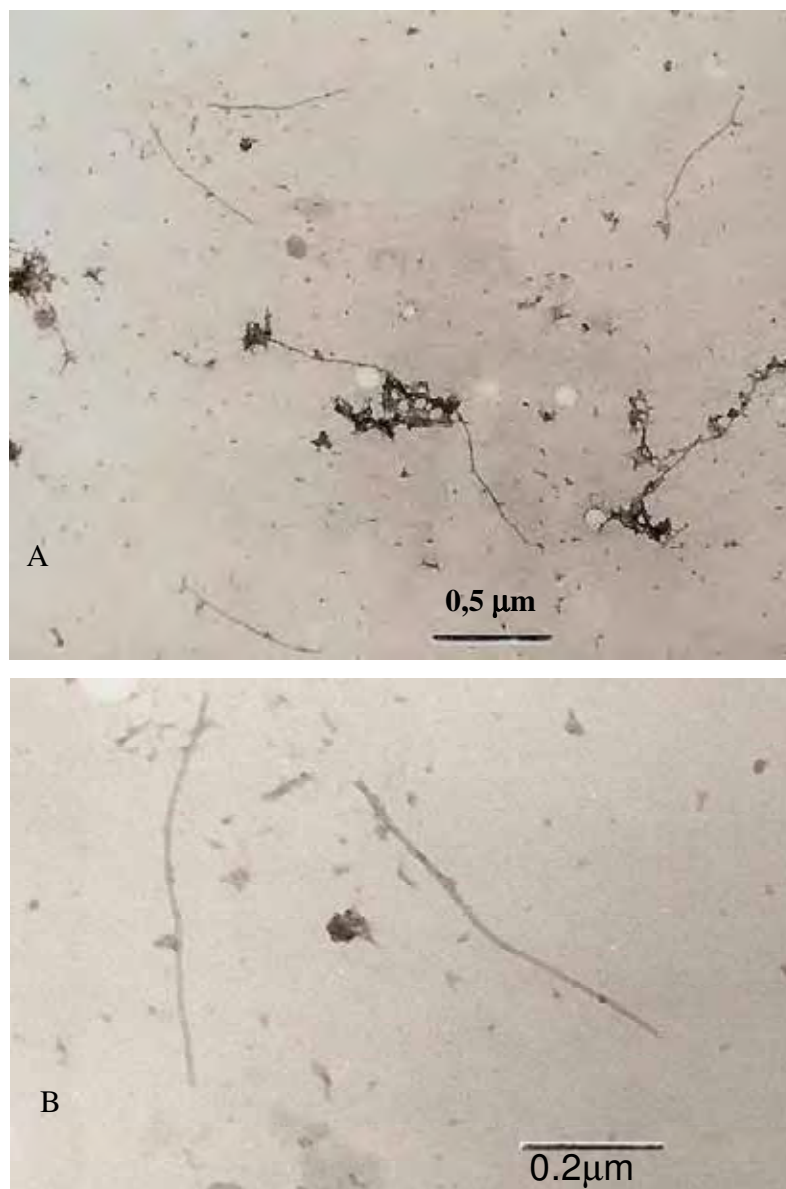


Figura 17 – Eletrofotomicrografia de partículas de BiMV após o processo de diálise. Aumento de 23.000 (A) e 77.500 (B) vezes.

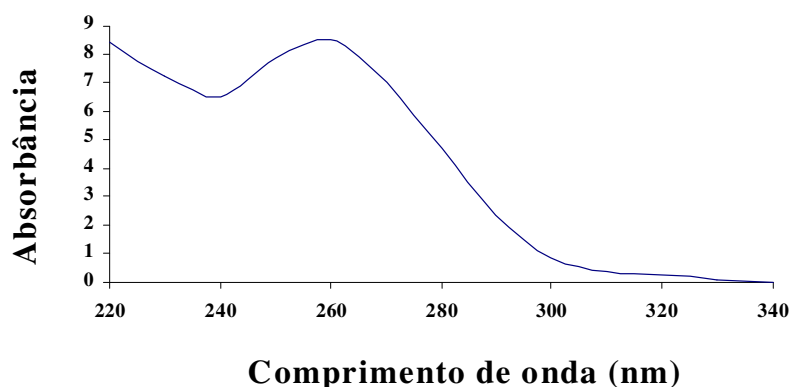


Figura 18. Espectro de absorvância em luz ultravioleta do isolado BiMV-13 purificado.

6.5. Obtenção do anti-soro e PTA-ELISA

A partir do purificado viral bruto obteve-se anti-soro produzido em coelhos da raça Nova Zelândia. Utilizando-se o ELISA indireto (PTA-ELISA), o anti-soro resultou em reações específicas na detecção do BiMV proveniente de *C. quinoa* e alface Trocadero infectadas. O anti-soro obtido de um coelho não-imunizado não apresentou reações com plantas sadias e nem infectadas. Porém visando obter um melhor título realizou-se a purificação da imunoglobulina. Esta quando utilizada em testes de PTA-ELISA foi eficiente na detecção do BiMV a partir de alface, *C. quinoa* e *B. pilosa*. A combinação que resultou no melhor valor de absorvância para as amostras infectadas, foi a diluição do extrato vegetal a 1:20 e do antissoro 1:200 (Tabela 11).

Este anti-soro foi utilizado no levantamento inicial visando verificar a ocorrência deste vírus nos campos de produção de alface do Estado de São Paulo, no outono de 2008. As amostras foram testadas também após inoculação em *C. quinoa*, que resultou em maiores valores de absorvância no teste PTA-ELISA.

Tabela 11. Dados de absorvância (medidos a 405 nm) para as diferentes diluições do extrato vegetal e do anti-soro.

| Amostra | Diluição Extrato | Diluição do antissoro | | |
|-------------------------|------------------|-----------------------|--------|--------|
| | | 1:100 | 1: 200 | 1: 500 |
| <i>C. quinoa</i> sadia | 1:10 | 0,308 | 0,299 | x |
| <i>C. quinoa</i> doente | 1:10 | 1,174 | 1,05 | x |
| <i>C. quinoa</i> sadia | 1:20 | 0,093 | 0,213 | 0,001 |
| <i>C. quinoa</i> doente | 1:20 | 0,248 | 0,939 | 0,062 |
| Alface sadia | 1:10 | 0,001 | 0,002 | x |
| Alface doente | 1:10 | 0,001 | 0,145 | x |
| Alface sadia | 1:20 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Alface doente | 1:20 | 0,16 | 0,122 | 0,079 |
| <i>B. pilosa</i> sadio | 1:10 | x | 0,072 | 0,052 |
| <i>B. pilosa</i> doente | 1:10 | x | 0,166 | 0,120 |
| <i>B. pilosa</i> sadio | 1:20 | x | 0,056 | 0,016 |
| <i>B. pilosa</i> doente | 1:20 | x | 0,168 | 0,091 |

x- amostra não testada

Através do teste PTA-ELISA foram verificadas apenas 2 amostras positivas, ambas na região de Mogi das Cruzes, de um total de 107 amostras analisadas (Tabela 12). Deste total, somente 31 isolados causaram sintomas em *C. quinoa*, e a maior parte destes causaram sintomas de lesões locais necróticas, típicas de vira-cabeça, causada por vírus do gênero *Tospovirus*. Nesta época (outono) a população dos afídeos, vetores de BiMV costuma ser baixa, resultando numa baixa ocorrência dos vírus transmitidos por pulgões. A amostra de BiMV proveniente de alface Romana teve resultado positivo apenas a partir de *C. quinoa*, provavelmente devido a maior concentração viral nesta hospedeira. Kuhn et al. (1982) também relataram a baixa concentração do BiMV nas hospedeiras estudadas através de microscopia eletrônica. Portanto, apesar do teste PTA-ELISA ter sido eficiente na diagnose de BiMV, devido à característica do vírus ocorrer em baixas concentrações nos hospedeiros, a diagnose através de RT-PCR se mostrou mais prática e eficiente.

Tabela 12. Número de amostras de alface coletadas no outono de 2008, infectadas com BiMV através do teste de ELISA.

| Região | Produtor | Tipo/cultivar | Número de plantas | Sintoma em <i>C.quinoa</i> | Resultado ELISA* (+/-) |
|-----------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Bauru | Seiti Sato | Lisa/Elisa | 18 | 2 | 0/18 |
| Bauru | Seiti Sato | Americana/Lucy Brown | 12 | 8 | 0/12 |
| Bauru | Seiti Sato | Mimosa | 5 | 2 | 0/5 |
| Bauru | Nilson (Lençóis Pta.) | Americana | 2 | 1 | 0/2 |
| Campinas | Kiomy Nakagawa | Mimosa | 2 | 1 | 0/2 |
| Campinas | Márcio do Espírito Santo | Americana | 7 | 3 | 0/7 |
| Campinas | Márcio do Espírito Santo | Mimosa | 3 | 0 | 0/3 |
| Campinas | Márcio do Espírito Santo | Crespa/Bruna R | 3 | 1 | 0/3 |
| Campinas | Márcio do Espírito Santo | Lisa | 2 | 0 | 0/2 |
| Campinas | Denílson Sedamo | Americana | 2 | 0 | 0/2 |
| Campinas | Denílson Sedamo | Lisa | 3 | 0 | 0/3 |
| Campinas | Denílson Sedamo | Crespa | 2 | 0 | 0/2 |
| Mogi das Cruzes | Luis Yano | Mimosa | 9 | 7 | 0/9 |
| Mogi das Cruzes | Edson Yamamoto | Crespa/ Amanda | 4 | 2 | 1/3 |
| Mogi das Cruzes | Edson Yamamoto | Lisa/Elisa | 3 | 0 | 0/3 |
| Mogi das Cruzes | Edson Yamamoto | Romana | 4 | 3 | 1/3 |
| Mogi das Cruzes | Edson Yamamoto | Mimosa | 3 | 0 | 0/3 |
| Mogi das Cruzes | Hiroshi Shintate | Lisa | 19 | 1 | 0/19 |
| Mogi das Cruzes | Hiroshi Shintate | Mimosa | 4 | 0 | 0/4 |

* (+ número de plantas positivas/ - número de plantas negativas)

6.6. Estimativa do Peso molecular da proteína capsidial

Na análise do gel de poliacrilamida detectou-se a presença da possível proteína capsidial do isolado BiMV-13, com massa molecular estimada em 33 kDa (Figura 19). Resultado semelhante foi observado por Nagata et al. (1995) com um isolado proveniente de ervilha.

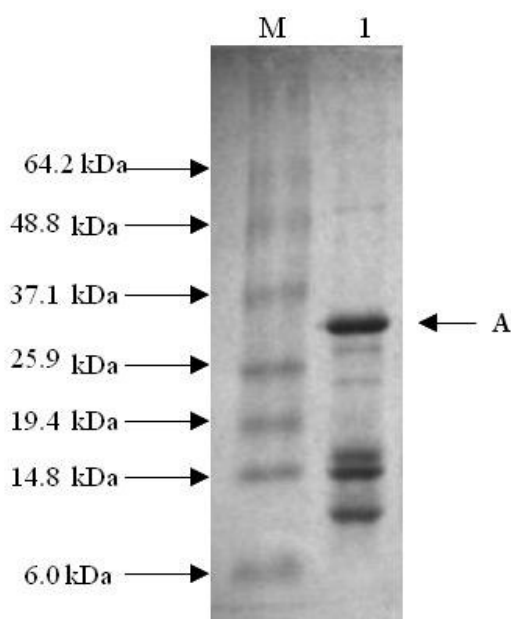


Figura 19. Padrão de proteínas observado em gel de poliacrilamida. M: Marcador de Proteína BenchMarckTM Pré-Stained Protein Ladder (Invitrogen); 1: Purificado viral A: possível proteína capsidial.

Apesar do aparecimento de bandas de peso molecular menores ao esperado, não foi observada reação inespecífica do anti-soro com extrato de plantas sadias.

6.7. Obtenção de oligonucleotídeos específicos

Os oligonucleotídeos 8851sens e 9211ant amplificaram eficientemente o fragmento de 360 bp (Figura 20), a partir de amostras de alface, picão e *C.*

quinoa através de RT-PCR em uma única etapa utilizando-se RNA total extraído através do método de Bertheau et al. (1998). A confirmação de que se tratava de fragmento viral do BiMV foi realizada pelo sequenciamento do produto de PCR de amostras provenientes de picão. Estas apresentaram identidade de aminoácidos de 99% com outros isolados de BiMV.

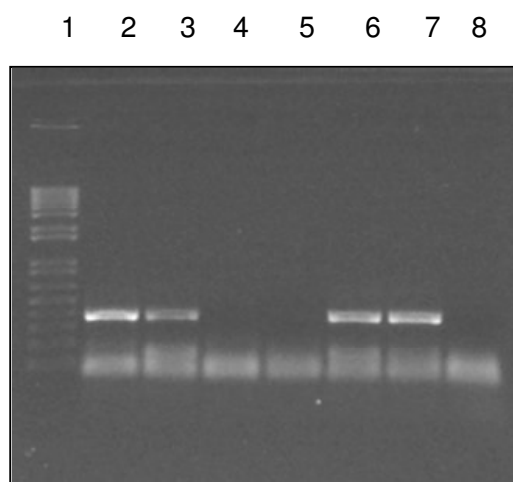


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 0,9% dos produtos de RT-PCR amplificados pelos oligonucleotídeos BiMV 8851 e BiMV 9211. (1) Marcador 1KB; (2) Alface infectada com BiMV; (3) *Bidens pilosa* infectada com BiMV; (4) Alface sadia; (5) *Bidens pilosa* sadio; (6) *Galinsoga parviflora* infectada com BiMV; (7) Alface controle positivo; (8) Controle negativo.

6.8. Levantamento da ocorrência de BiMV nas regiões produtoras de alface

Após a padronização do teste de RT-PCR foram realizadas coletas nas regiões produtoras de Bauru, Campinas e Mogi das Cruzes, nas épocas de primavera e outono. Os resultados estão descritos na tabela 13. De um total de 222 amostras de alface sintomáticas coletadas 2,25% apresentaram-se infectadas por BiMV, 6,75% apresentaram-se infectadas por LMV e 30,2% estavam infectadas por LeMoV.

Tabela 13 - Detecção através de RT-PCR dos vírus BiMV, LMV e LeMoV em plantas de alface sintomáticas em diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo nos anos de 2008 e 2009.

| Cultivar/ Total | Região | Época | Apenas BiMV | Apenas LMV | Apenas LeMoV | BiMV+ LeMoV | LMV+ LeMoV | Negativas |
|----------------------------|--------------------|--------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|------------------|
| Mimosa/8 | Mogi das Cruzes | Set/08 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| Elisa/14 | Mogi das Cruzes | Set/08 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 11 |
| Crespa/8 | Mogi das Cruzes | Set/08 | 0 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Veneranda/2 | Mogi das Cruzes | Set/08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Elisa/13 | Bauru | Out/08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| Mimosa/8 | Bauru | Out/08 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| Americana/6 | Bauru | Out/08 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 |
| Americana/5 | Holambra | Out/08 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Romana/1 | Holambra | Out/08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Vanda/27 | Campinas | Nov/08 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 | 1 |
| Mimosa/9 | Campinas | Nov/08 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 | 2 |
| Ceres/6 | Campinas | Nov/08 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| LucyBrown/2 | Campinas | Nov/08 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Mimosa/6 | Campinas | Abril/09 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Crespa/8 | Campinas | Abril/09 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| Americana/3 | Campinas | Abril/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Elisa/1 | Campinas | Abril/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Elisa/3 | Bauru | Mai/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Crespa/1 | Bauru | Mai/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Mimosa/12 | Mogi das Cruzes | Junho/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |

(Continuação)

| Cultivar/ Total | Região | Época | Apenas BiMV | Apenas LMV | Apenas LeMoV | BiMV+ LeMoV | LMV+ LeMoV | Negativas |
|----------------------------|--------------------|--------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|------------------|
| Elisa/8 | Mogi das Cruzes | Junho/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| Americana/5 | Mogi das Cruzes | Junho/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Crespa/4 | Mogi das Cruzes | Junho/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Americana/13 | Bauru | Set/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| Mimosa/9 | Bauru | Set/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| Elisa/6 | Bauru | Set/09 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| Crespa/18 | Campinas | Set/09 | 0 | 1 | 6 | 0 | 1 | 10 |
| Mimosa/14 | Campinas | Set/09 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 7 |
| Elisa/1 | Campinas | Set/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Americana/1 | Campinas | Set/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Realizou-se também a coleta de plantas daninhas com sintomas de mosaico e que podem estar servindo como fonte de inóculo para o BiMV (Tabela 14). De um total de 60 amostras de *B. pilosa* com sintomas de mosaico verificou-se que 45% apresentaram-se infectadas por BiMV, e 10% por LeMoV e de um total de 52 amostras de *Galinsoga parviflora* sintomáticas verificou-se que 5,75% estavam infectadas por BiMV e 23% infectadas com LeMoV, nenhuma planta daninha coletada apresentou infecção por LMV. Verificou-se que a primavera foi a época que apresentou maior ocorrência de BiMV, assim como de LMV e LeMoV.

Tabela 14 - Detecção através de RT-PCR dos vírus BiMV, LMV e LeMoV em outras culturas ou plantas daninhas sintomáticas em diferentes regiões produtoras do Estado de São Paulo nos anos de 2008 e 2009.

| Planta/Total | Região | Época | Apenas BiMV | Apenas LMV | Apenas LeMoV | BiMV+ LeMoV | Negativas |
|--------------------------|--------------------|--------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| Espinafre/1 | Mogi das Cruzes | Set/08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Mostarda/1 | Mogi das Cruzes | Set/08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. pilosa</i> /10 | Bauru | Out/08 | 9 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. pilosa</i> /9 | Mogi Mirim | Out/08 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. pilosa</i> /13 | Campinas | Nov/08 | 7 | 0 | 1 | 0 | 5 |
| <i>G. parviflora</i> /1 | Campinas | Nov/08 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Coentro/1 | Campinas | Nov/08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>G. parviflora</i> /23 | Campinas | Abril/09 | 2 | 0 | 4 | 0 | 17 |
| <i>B. pilosa</i> /5 | Campinas | Abril/09 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| <i>C. quinoa</i> /3 | Bauru | Mai/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>B. pilosa</i> /4 | Bauru | Mai/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| <i>G. parviflora</i> /6 | Bauru | Mai/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| Almeirão/1 | Bauru | Mai/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>G. parviflora</i> /15 | Mogi das Cruzes | Junho/09 | 0 | 0 | 1 | 0 | 14 |
| <i>B. pilosa</i> /1 | Mogi das Cruzes | Junho/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Mostarda/3 | Mogi das Cruzes | Junho/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>B. pilosa</i> /8 | Bauru | Set/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| <i>B. pilosa</i> /10 | Campinas | Set/09 | 0 | 0 | 4 | 1 | 5 |
| <i>G. parviflora</i> /7 | Campinas | Set/09 | 0 | 0 | 6 | 0 | 1 |
| Falsa-serralha/1 | Campinas | Set/09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Almeirão/3 | Campinas | Set/09 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |

Através dessa amostragem constatou-se que a incidência de BiMV nas regiões produtoras de alface é baixa, conforme já havia sido sugerido por Hasegawa (2006). Porém, a ocorrência de BiMV no campo esteve intimamente relacionada com a presença de plantas daninhas, como *B. pilosa* (picão-preto) e em *Galinsoga parviflora* (conhecida popularmente como fazendeiro ou picão-branco), esta última hospedeira encontrada frequentemente junto aos canteiros comerciais de alface na região de Campinas, ainda não havia sido relatada como hospedeira para o BiMV e LeMoV. Sintomas de mosaico eram frequentes nesta espécie de planta, bem como em picão preto (Figura 21).

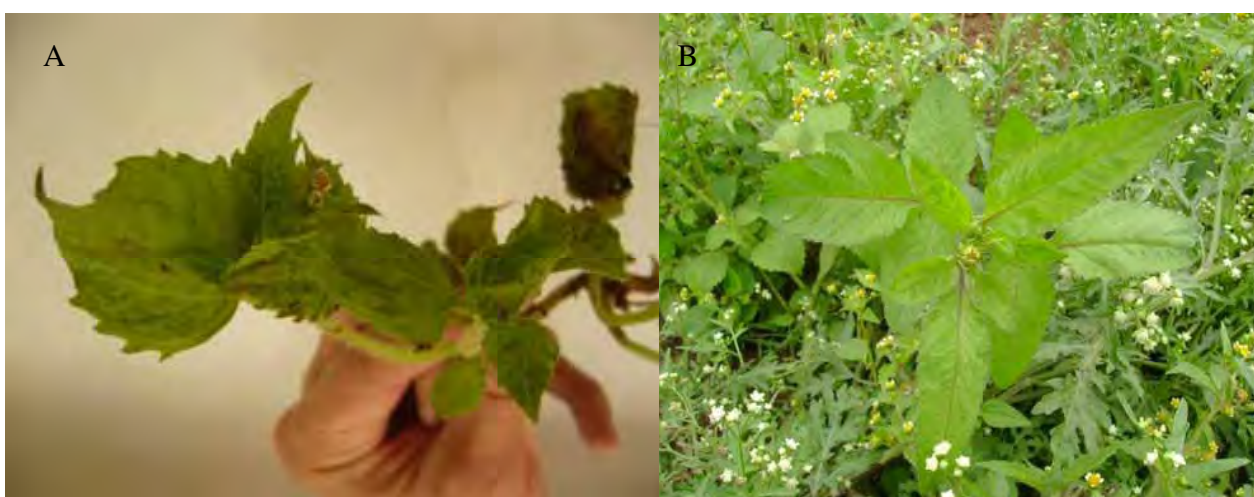


Figura 21– *Galinsoga parviflora* (fazendeiro) (A) coletado na região de Campinas com sintomas de mosaico e *Bidens pilosa* (picão preto) com sintoma de mosaico junto a plantio de alface na região de Campinas (B), ambos infectados por BiMV.

Brunt et al. (1990) já haviam alertado que muitas plantas invasoras, ornamentais e cultivadas, pertencentes à família Asteraceae, são hospedeiras naturais dos vírus que infectam a cultura da alface, sendo possivelmente, reservatórios de vírus no campo. Em recente levantamento no cinturão-verde de São Paulo, Chaves et al. (2007) demonstraram o papel do *Sonchus oleraceus* e *S. asper*, como reservatórios naturais de LMV e LBVaV, porém não observaram ocorrência de vírus em *B. pilosa* e *G. parviflora*.

Verificou-se infecção mista de BiMV com LeMoV em uma amostra de alface e outra de *G. parviflora*, ambas na região de Campinas. Estes dois vírus aparentemente possuem diferentes vetores, sendo que dados preliminares indicam que o LeMoV é transmitido por *Hyperomyzus lactucae* (PAVAN et al., 2005) e o BiMV não é transmitido por esta espécie de afídeo (RODRIGUES et al., 1991).

Estes dados demonstram a importância do manejo preventivo através da eliminação de plantas daninhas, especialmente *B. pilosa* e *G. parviflora* que se mostraram potenciais fontes de inóculo para BiMV e LeMoV, pois ambos os vírus são transmitidos por espécies de afídeos que são capazes de estabelecer grandes colônias em espécies da vegetação espontânea (SOUSA-FILHO & ILHARCO, 1995) e assim facilitar a disseminação dos vírus dentro da cultura.

7. CONCLUSÕES

- 1) O BiMV não é um membro da espécie PVY;
- 2) Oligonucleotídeos específicos para diagnose do BiMV em RT-PCR de uma só etapa e anti-soro policlonal contra o vírus foram obtidos;
- 3) A ocorrência de BiMV em alface nas regiões produtoras de Bauru, Campinas e Mogi das Cruzes foi baixa, porém o mesmo foi encontrado com alta incidência em plantas daninhas como *Bidens pilosa* e *Galinsoga parviflora*;
- 4) A maioria das cultivares comerciais de alface testadas não são tolerantes ao isolado BiMV-13;
- 5) *Galinsoga parviflora* (fazendeiro) e *B. pilosa* (picão-preto) são hospedeiras tanto do BiMV como do LeMoV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F. **Probable cleavage sites on all published sequences within the family *Potyviridae* (DPVweb)** 2004. Disponível em <<http://www.dpvweb.net>> Acesso em 10 mai 2009.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. **Molecular Plant Pathology**, v.6, n.4, p.471-487, 2005a.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Archives of Virology**, v.150, p.459-479, 2005b.

ALMEIDA, A.M.R. Detecção e quantificação de vírus pelo teste de ELISA. In: Almeida, A.M.R.; Lima. J.A.A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. p.63-94. 2001.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Vol.3. Viçosa, 1986. 326p.

BERGER, P.H., ADAMS, M.J., BARNETT, O.W., BRUNT, A.A., HAMMOND, J., HILL, J.H., JORDAN, R.L., KASHIWAZAKI, S., RYBICKI, E., SPENCE, N., STENGER, D.C., OHKI, S.T., UYEDA, VI., VAN ZAAYEN, A., VALKONEM, J., AND VETTEN, H.J. *Potyviridae* In: FAUQUET, C. M., MAYO, M. A, MANILOFF, J., DESSELBERGER, V., BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press, 1259p, 2005.

BERTHEAU, Y., FRECHON D., TOTH, I. K , HYMAN, L.J. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). IN: PEROMBOLON, M. C. M. & van der WOLFF, J. M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes**. Scottish Crop Research institute Occasional Publication, 1998.

- BEZERRA, D.R., LIMA, J.A.A. ; XAVIER FILHO, J. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.553-560, 1995.
- BLACK, L.M.; BRAKKE, M.K.; VATTER, A.E. Purification and electron microscopy of tomato spotted wilt virus. **Virology**, v.20, p.120-130, 1963.
- BOS, L. Potyviruses chaos or order? **Arch Virol. Suppl.** v. 5, p.31-46. 1992.
- BOS, L. Persistence of infectivity of three viruses in plant material dried over CaCl₂ and stored under different conditions. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.83, p.217-220, 1977.
- BRUNT, A.; GRABTREE, K.; GIBBS, A. **Viruses of tropical plants**. Redwood Press Ltd., 1990. 707 p.
- CAMPBELL, R.N. Fungal transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 34. p.87-108, 1996.
- CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; GALLETI, S.R. *Sonchus asper* e *S. oleraceus* como reservatórios naturais de vírus em cultivos de alface no cinturão-verde de São Paulo. **Arq.Inst.Biol.**, São Paulo, v.74, n.2, p.101-106, 2007.
- CHEN, S.; DAS,P.; HARI,V. In situ localization of ATPase activity in cells of plants infected by maize dwarf mosaic potyvirus. **Arch. Virol.** v.134, p.433-439. 1994.
- CHRISTIE, S. R. ; EDWARDSON, J. R. ; ZETTLER, F. W. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from *Bidens* and *Lepidium*. **Plant Disease Reporter**, v. 52, n. 10, p. 763-776, 1968.
- COLARICCIO, A.; ROGGERO, P.; CHAGAS, C.M.; EIRAS, M.; CESAR, E.P.G. Identificação serológica do *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) em alface, pimentão e fumo no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.347, 1995.
- COLARICCIO, A., CHAVES, A.L.R., EIRAS, M., ROGGERO, P., PALAZZO, S.R.L., COSSA, A.C. Diversidade de fitovírus em asteráceas no cinturão verde de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.1., p.63, 2003a.
- COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; CHAGAS, C.M.; LENZI, R.; ROGGERO, P. Presence of lettuce big-vein disease and associated viruses in a subtropical area of Brazil. **Plant Pathology**. V.52, p.792. 2003b.
- COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W. Virus do mosaico do picão ataca girassol. **Supl. Agric. "O Estado de São Paulo"**. n.605, 30 nov. 1966. p.12-13.

COSTA, C. P; SALA F. A evolução da alfacultura brasileira. **Horticultura Brasileira**. v. 23, n. 1, 2005.

DE ÁVILA, A.C.; DE HANN, P.; SMEETS, M.L.L; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W.; GOLDBACH, R.W.; PETERS, D. Distinct levels of relationship between tospovirus isolates. **Archives of Virology**, v.128, n.2, p.211-227, 1993.

DE AVILA, A.C.; LIMA, M.F.; RESENDE,R.O.; POZZER, L.; FERRAZ, E.; MARANHÃO, E.A.A.; CANDEIA, J.A.; COSTA, N.D. Identificação de tospovirus em hortaliças no submédio São Francisco utilizando DAS-ELISA e DOT-BLOT. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p.503-508, 1996.

DINANT, S.; LOT. H. Lettuce Mosaic Virus. **Plant Pathology**, v. 41, p.528-542, 1992.

DUJOVNY, G. ; USUGI, T.; SHOHARA, K.; LENARDON, S.L. Characterization of a potyvirus infecting sunflower in Argentina. **Plant Disease**. v. 82, n. 5, p. 470-474, 1998.

DUJOVNY, G.; SASAYA, T.; KOGANESAWA, H.; USUGI, T.; SHOHARA, K.; LENARDON, S.L.Molecular characterization of a new potyvirus infecting sunflower. **Archives of virology**, v.145, p.2249-2258, 2000.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, S. R. Lettuce Mosaic Virus. In: **The potyvirus group**. Gainesville: University of Florida. v. 2, p.572-588, 1991.

FILGUEIRA, F.A.R. Asteráceas – alface e outras hortaliças herbáceas. In: FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de Olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, p.289-295, 2000.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **J. Virol. Methods**, v.63, p.9-16. 1997.

GOTO, R. A cultura de alface. In: GOTO, R.; TIVELLI, S. W. (Org.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, cap. 5, p.137-159, 1998.

HA, C. ; COOMBS, S.;REVILL, P.A.;HARDING, R.M.; VU, M.; DALE, J.L.. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. **Archives of virology**, v.153, p.25-36, 2008.

HASEGAWA, J.M. **Identificação e caracterização de isolado de *Bidens mosaic virus* e triagem de alface para resistência**. 2006. 44f. . Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP.

HAYES, R.J., WINTERMANTEL, W.M., NICELY, P.A., RYDER, E.J.. Host resistance to Mirafiori lettuce big-vein virus and Lettuce big-vein associated virus and virus sequence diversity and frequency in California. **Plant Disease** v.90, p.233-239.2006.

- HEYWOOD, V. H.; HARBONE, J. B. **An overture to the Compositae**. v. 1, cap. 1, p.2-20, 1977.
- HONG, Y.; LEVAY, K.; MURPHY, J.F.; KLEIN, P.G.; SHAW, J.G.; HUNT, A.G. A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in the yeast cells. **Virology**, v.214, p.159-166. 1995.
- HONG, Y.; HUNT, A.G. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. **Virology**, v.226, p.146-151. 1996.
- IEA – Instituto de economia agrícola. **Área e Produção dos principais serviços da agropecuária do Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/bancoiea/subjetiva.aspx?cod_sis=1> Acesso em 30/05/2009.
- INOUE-NAGATA, A.K.; OLIVEIRA, P.A.; DUTRA, L.S.; NAGATA, T. Bidens mosaic virus is a member of the *Potato virus Y* species. **Virus Genes**, v.33, p.45-49. 2006.
- JADÃO, A. S. ; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; ZERBINI, F.M. Transmissão via semente do *Lettuce mosaic virus* (LMV) patótipos II e IV em diferentes genótipos de alface. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 28, 58-61,2002.
- JADÃO, A. S. **Caracterização parcial e desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para detecção de Sequivirus infectando alface**. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- JAGGER, I.C.; CHANDLER, N. Big Vein, a disease of lettuce. **Phytopathology**. St. Paul, v. 24, p.1253- 1256, 1934.
- JONES, R.A.C. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. **Virus Research**, v.100, p.5-30, 2003.
- KASTEEL, D.; WELLINK, J.; VERVER, J.; VAN LENT, J.; GOLDBACH, R.; VAN-KAMMEN, A. The involvement of cowpea mosaic virus M RNA-encoded proteins in tubule formation. **J. Gen. Virol.** v.74, p.1721-1724. 1993.
- KITAJIMA, E. W. ; CARVALHO. A. M. B. ; COSTA, A. S. Morfologia do vírus do mosaico do picão. **Bragantia**, Campinas, v. 20, n. 13, p. 503-512, 1961.
- KITAJIMA E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. **Journal of Electron Microscopy**, v. 14, p. 119-121, 1965.
- KRAMER, M.; ORLANDO, A.; SILBERSCHMID, T. Estudos sobre uma grave doença de vírus, responsável pelo depercimento de nossas culturas de alface. **O Biológico**, São Paulo. v. 11, p.121-134, 1945.

- KRAUSE-SAKATE, R.; LE GALL, O.; PAVAN, M.A.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Systemic necrosis caused by two isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) in lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars possessing the Mo2 gene. **Virus Reviews and Research**, (Supplement), v. 4, p.153. 1999.
- KRAUSE-SAKATE, R.; LE GALL, O.; FAKHFAKH, H.; PEYPELUT, M.; MARRAKCHI, M.; VARVERI, C.; PAVAN, M.A.; SOUCHE, S.; HERVÉ LOT; ZERBINI, F.M.; CANDRESSE, T. Molecular characterization of *Lettuce mosaic virus* field isolates reveals the emergence and spread of a resistance-breaking strain, LMV-Most. **Phytopathology**, v.92, p.563-571, 2002.
- KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M.A.; SILVA, N.; GOTO, R. O “big vein” ataca. **Cultivar HF**. Pelotas, v.IV, n.22, p.13, 2003.
- KRAUSE-SAKATE, R.; FIRMINO, A.C.; JADÃO, A.S.; PAVAN, M.A.; SILVA, N.; HANAI, S.M.; ANBO, R.H.; NIETZSCHE, T. Ocorrência generalizada do Lettuce mottle virus em três regiões produtoras de alface do Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.88-89, 2008.
- KUHN, G.B.; LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W. Comparação entre o vírus do mosaico do picão e o Bidens mottle virus. **Fitopatologia Brasileira**, v.3, p.93, 1978.
- KUHN, G. B. ; LIN, M. T. ; COSTA, C. L. Transmissão, círculo de hospedeiras e sintomatologia do vírus do mosaico do picão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 39-50, 1980.
- KUHN, G. B. ; LIN, M. T. ; KITAJIMA, E. W. Algumas propriedades do vírus do mosaico do picão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 185-195, 1982.
- KUMAR, S.; TAMURA, K; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** v. 5: p. 150-163, 2004.
- KUWATA, S. ; KUBO, S.; YAMASHITA, S.; DOI, Y. Rod-shaped particles, a probable entity of lettuce big vein virus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. v.49, p.246-251. 1983.
- LAIN, S.; RIECHMANN, J.L.; GARCIA, J.A. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive-strand RNA virus. **Nucl. Acids Res.** v. 18, p.7003-7006. 1990.
- LANE, L. A general method for detecting plant viruses. In: Maramorosch, K. (Ed.) **Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin**. New Delhi. Oxford & IBH Publishing. 1992. pp.1-15.
- LANGENBERG, W.G.; ZHANG, L. Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. **J. Struct. Biol.** v.118, p.243-247. 1997.

LANGEVELD, S.A. ; DORE,J.M.; MEMELINK, J.; DERKS, A.F.; VAN DER VLUGT, C.I. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. **J. Gen. Virol.** v.72, p.1531-1541. 1991.

LATHAM, L.J.; JONES, R.A.C. Deploying partially resistant genotypes and plastic mulch on the soil surface to suppress spread of lettuce big-vein disease in lettuce. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 55, n.2, p.131-138. 2004.

LIAO, J.Y.; HU, C.C.; CHEN,C.C.; CHANG,C.H.; DENG, T.C. Full-length sequence analysis of a distinct isolate of *Bidens mottle virus* infecting sunflower in Taiwan. **Archives of Virology**, v.154, p.723-725, 2009.

LOPEZ-MOYA, J.J.; WANG, R.Y.; PIRONE, T.P. Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. **Journal of General Virology**, v.80, p.3281-3288, 1999.

LOT, H.; CAMPBELL, R.N.; SOUCHE, S.; MILNE, R.G.; ROGGERO, P. Transmission by *Olpidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and *Lettuce big-vein virus*, and Their Roles in Lettuce Big-Vein Etiology. **Phytopathology**. St. Paul, v. 92, n. 3. p.288-293, 2002.

MAIA, I.G.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **J. Gen. Virol.** v.77, p.1335-1341. 1996;

MARINHO, V. L. A. ; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; COSTA, C.L.Characterização do vírus do mosqueado da alface. **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, n. 3, p.543, 1982.

MARINHO, V.L.A.; KITAJIMA, E.W. Um método simplificado de purificação de potyvirus. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.91-93, 1989.

MARITAN, A.C., GASPAR, J.O.; CAMARGO, L.E.A. Identificação e caracterização de um potyvirus isolado de *Zinnia elegans*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.28-33. 2004.

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.15, p.233-237, 1987.

MURPHY, F. A. ; FAUQUET,C.M. ;BISHOP,D.H.L. ; GHABRIAL,S.A. ;JARVIC,A.W. ; MARTELLI,G.P. ; MAYO,M.A. ; SUMMERS,M.D. (Ed.)Virus Taxonomy. Sixty Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Arch. Virol.**, n. 10, 1995. (Suplemento), 586 p.

NAGATA, T. ; INOUE, A. K. ; DUSI, A. N. ; KITAJIMA, E. W. *Bidens mosaic potyvirus* newly isolated from pea, its characteristics and serological relationship with other potyviruses. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 473-478, 1995.

NAVARRO, J.A.; BOTELLA, F.; MARUHENDA, A.; SASTRE, P.; SÁNCHEZ-PINA, M.A.; PALLAS, V. Comparative infection progress analysis of *Lettuce big-vein virus* and *Mirafiori lettuce virus* in lettuce crops by developed molecular diagnosis techniques.

Phytopathology, St. Paul, v. 94, n. 5. p.470-477, 2004.

NICHOLAS, O.; LALIBERTE, J.F. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. **J. Virol. Methods**, v.32, p.57-66, 1991.

PAPPU, S.S. ; BRAND, R. ; PAPPU, H.R. ; RYBICKI, E.P. ; GOUGH, K.H. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. **J. Virol. Methods**. v.41, p.9-20. 1993.

PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, 4ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, p.27-33, 2005.

PAVAN, M. A.; KUROZAWA, C. Doenças de alface (*Lactuca sativa* L.). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, 3ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, cap. 4, p.18-25, 1997.

PETERS, D. ; DE AVILA, A.C.; KITAJIMA, E.W.; RESENDE.R.O.; DE HAAN, P.; GOLDBACK, R.W. An overview of Tomato spotted wilt virus. In: HSU, H.T. & LAWSON, R.H. (Ed.) **Virus-trips-plant interactions of TWSV**. Springfield, p.1-14, 1991.

PINK, D. A. C.; LOT, H.; JOHNSON, R. Novel pathotypes of lettuce mosaic virus breakdown of a durable resistente. **Euphytica**, v. 63, p.169-174, 1992.

POZZER, L.; RESENDE,R.O.; LIMA, M.I.; KITAJIMA, E.W.; GIORDANO, L.B.; DE AVILA, A.C. Tospovirus: uma visão atualizada. In: LUZ, W.C. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Planta (RAPP)**. Passo Fundo-RS, v.4, p.95-148, 1996.

PURCIFULL, D.E.; CHRISTIE, S.R.; ZITTER, T.A. Bidens mottle virus. **C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses** , Surrey,England, n°161, 1976.

RESTREPO-HARTWIG, M.A.; CARRINGTON, J.C. Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. **J. Virol.**, v.66, p.5662-5666. 1992.

RESTREPO-HARTWIG, M.A.; CARRINGTON, J.C. The Tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. **J. Virol.** V.68, p.2388-2397, 1994.

REVERS, F.; LOT, H.; SOUCHE, S.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; DUNEZ J. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. **Phytopathology**, v. 87, p. 397-403, 1997.

- RIECHMANN, J.L.; LAIN,S.; GARCIA, J.A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **J. Gen. Virol.**, v.73, p.1-16. 1992.
- RODRIGUES, M. G. R. ; MARINHO, V. L. A. ; RIBEIRO, S. G. ; KITAJIMA, E. W. Mosaico em margarida-amarela (*Coreopsis lanceolata*) causada pelo Vírus do Mosaico do Picão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 114-117, 1991.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; AMMAR, E.D.; PIRONE, T.P.; SHAW, J.G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. **J. Gen. Virol.**, v.74, p.1945-1949. 1993.
- ROGGERO,P.; LOT, H.; SOUCHE, S.; LENZI, R.; MILNE, R.G. Occurrence of Mirafiori lettuce virus and *Lettuce big-vein virus* in relation to development of big-vein symptoms in lettuce crops. **European Journal of Plant Pathology**. Dordrecht, v. 109, p. 261-267, 2003.
- RYAN, M.D.; FLINT, M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. **J. Gen. Virol.** v.78, p.699-723. 1997.
- RYDER, E. J. Transmission of common lettuce mosaic virus through the gametes of lettuce plants. **Plant Disease. Rep.** v. 48, p.522-523, 1964.
- SALA, F. C.; COSTA C. P. 'PIRAROXA': Cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p.158-159, 2005.
- SALAS, F. S. Controle de insetos-vetores causadores de viroses em hortaliças. In: REUNIÃO INTINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, IV. **Anais...** Ribeirão Preto, 2001.
- SANCHES, M.M.; KRAUSE-SAKATE, R.; ZERBINI, F.M.; ROSALES,M.; LE GALL, O.; PAVAN, M.A. Frequência do Lettuce big-vein associated virus e Mirafiori lettuce big-vein virus em plantas de alface sintomáticas e assintomáticas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.4, p.378-382. 2007.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. **J. Gen. Virol.** V.69, p.2703-2710, 1988.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Structure of potyvirus coat protein and its application in the taxonomy of the potyvirus group. **Adv. Virus Res.**, v.36, p. 273-314. 1989.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. **The Potyviridae**. CAB International, Wallingford, 1994. 516p.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A.; BERGER,P.H. **Potyviridae family. AAB descriptions of plant viruses n°366.** 1998. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=366>.

SILVA, A.K.F.; INOUE-NAGATA, A.K.; ROCHA, W.B.; NAGATA, T. Partial sequence of HC-Pro gene of Bidens mosaic virus analyzing comparison with other potyviruses. **Virus Reviews and Research**, v.12, suplemento 1, p.238. 2007.

SLEUTJES, P. S. **Manejo integrado de viroses na cultura do pepineiro (*Cucumis sativus* L.) em ambiente protegido**. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SOUZA-FILHO, C.R.; ILHARCO, F.A. **Afídeos do Brasil e suas Plantas Hospedeiras: Lista Preliminar**. São Carlos: EDUFSCar, 1995. 85p.

SYLVESTER, E. S. Lettuce mosaic virus transmission by the green peach aphid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, p.357-369, 1955.

TRANI, P.E.; TIVELLI, S.W.; PURQUERIO, L.F.V.; AZEVEDO FILHO, J.A. **Boletim 200-Alface (*Lactuca sativa* L.)**. Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura- IAC. 2005. Disponível em <<http://www.abhorticultura.com.br/news/default.asp?id=4465>> Acesso em 05/07/2009.

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

WARD, C.W.; SHUKLA, D.D. Structure and variation of potyviruses. In: RISHI, N.; AHUJA, K.L.; SINGH, B.P. (ed.) **Virology in the tropics**. New Delhi, p. 43-61, 1994.

WIJKAMP, I. ; ALMARZA, N.; GOLDBACH, R.; PETERS, D. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathology**, v.85, p.1069-1074, 1995.

YOUSSEF, F.; MARAIS, A.; CANDRESSE, T. Partial genome sequence of Bidens mottle virus sheds light on its taxonomy. **Archives of virology**, v.153, p.227-228, 2008.

ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A Família Potyviridae – Parte I. In: LUZ, W.C. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**. Passo fundo, p.1-66, 1999.

ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. **Introdução à Virologia Vegetal**, Viçosa, 2002. 145p.

ZHENG, L.; WAYPER, P.J.; GIBBS, A.J.; FOURMENT, M.; RODONI, B.C.; GIBBS, M.J. Accumulating variation at conserved sites in Potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. **PLoS ONE** v.3, n.2, p. e1586. 2008. Disponível em <<http://www.plosone.org>> acesso em 10.out.2008

ZINK, F.W.; GROGAN, R.G. The interrelated effects of big vein and market price on the yield of head lettuce. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.38, p.844-846, 1954.

APÊNDICE

Apêndice 1. Sequência parcial do BiMV-SP, contendo parte da HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, Nib , CP e região 3'UTR com os aminoácidos conservados sublinhados e os sítios de clivagem em negrito e indicados pelo símbolo / .

HC-Pro

1 GCCGATTTTTCTCGAATTTCTTTGAAGAAGTTGATCCATCAAAGGATATGGCGCATACG
1 R F F S N F F E E V D P S K G Y G A Y E

61 AAATTAGAAAGAATCCCAATGGTGTGCGTAAATTGGCAATTGGAAATCTCATAGTGCCTC
21 I R K N P N G V R K L A I G N L I V P L

121 TTGACTTATCAGAATTCGACTGAAAATGAAAGGAGATTTTCATCAAACAACCAGACATTA
41 D L S E F R L K M K G D F I K Q P D I S

181 GCAAACAATGTGTAAGTCTAAAAGATGGTAATTACGTTTACCCGTGTTGTTGCACCACAC
61 K Q C V S L K D G N Y V Y P C C C T T L

241 TTGATGATGGCACGGCCGTGGAATCAACATTGTATCCACCCACAAAGAAGCATATGGTAA
81 D D G T A V E S T L Y P P T K K H M V I

301 TTGGCAACAGTGGTGAACAGAAGTATGTTGACTTACCAAAGGCGACTCAGAGATGCTTT
101 G N S G E Q K Y V D L P K G D S E M L Y

361 ATATTGCAAAAACAAGGATACTGCTATATAAACATATATCTGGCCATGCTGATAAACGTGA
121 I A K Q G Y C Y I N I Y L A M L I N V N

421 ATGAAGAGGATGCGAAAAGATTTACGAAGAAAGTTCGTGACATGTGCGTTCCAAAATTAG
141 E E D A K D F T K K V R D M C V P K L G

481 GGGAATGGCCATCGCTTATGGATGTAGCAACAACCTGCGCTCAGTTAAGAATATTTTACC
161 E W P S L M D V A T T C A Q L R I F Y P

541 CAGACGTTACGATGCAGAATTGCCACGAATTTTAGTCGATCACAACACACAAAACGTGTC
181 D V H D A E L P R I L V D H N T Q T C H

601 ACGTAGTCGATTTCGTACGGCTCAATGACTACTGGTTTTTACATTTTAAAAGCAGCCACAG
201 V V D S Y G S M T T G F H I L K A A T V

661 TTTCTCAACTCATTCTATTTGCTAACGACGAATTAGAATCAGACATCAAGCATTACAGGG
221 S Q L I L F A N D E L E S D I K H **Y R V**

P3

721 TTGGAGGTGTGCCTAACGACGCTAGCAACCTGAGTGACGGAGGTCGACCATTTGGAAGTG
241 **G/ G** V P N D A S N L S D G G R P F G S G

781 GAGGTGCAATGTTTAGTGAATTTACGCAACCAAGGTTTTAATACGTGGCATCTTTAGGC
261 G A M F S E F H A T K V L I R G I F R P

841 CTAAGGTAATGCAGCAACTATTGATAGACGAACCGTACATATTGCTTATGTCTATGCTAT
281 K V M Q Q L L I D E P Y I L L M S M L S

901 CTCCTGGGATTCTACTTGCTATGTACAACAATGGGTCGTTTGAATAGCCGTCAGCTAT

301 P G I L L A M Y N N G S F E I A V K L W
 961 GGATTAACGAAAAACAGTCTCTTGCAATGATTGCAACGATGTTGTCAGCTTTAGCAACAA
 321 I N E K Q S L A M I A T M L S A L A T K
 1021 AAGTTTCAGTGTGACACACACTTTTGGCACAGCGAAAGATAATGGACGCAGCAGCTGGTG
 341 V S V S D T L L A Q R K I M D A A A G D
 1081 ACTTACTGGAGGCAACATGCGATGGGTTTCAACTTCACATGACGTATCTCACAGCGATAA
 361 L L E A T C D G F Q L H M T Y L T A I T
 1141 CTTTGTGTCAGAGAGTGAAAGAACGTGCTGACAGCGATCATTCTTTAATCTCTGGAGGTT
 381 L L Q R V K E R A D S D H S L I S G G F
 1201 TTCTTAATTACGAAAGTGACGTTGTTCACTTAATGGAAAAAATTATCTAGATCTCTTAG
 401 L N Y E S D V V H L M E K N Y L D L L E
 1261 AGGAAGCTTGGAGAGATTTACGTTGGCACGAAAAGTTATCTGCAATTTGGCATTACAAA
 421 E A W R D L R W H E K L S A I W H S Q K
 1321 AGGCAAGGAAATTTATTGTAAAGCCTTTGCTCCCCACAGGCAGCGCAGATTTGAAAGGAA
 441 A R K F I V K P L L P T G S A D L K G M
 1381 TGTACGACATATCACCAAGAGCATGTTTTGGGAAGAGTTTAAATGCATTACAGAAGAAAA
 461 Y D I S P R A C F G K S L N A L Q K K R
 1441 GAGACGACTTCGCAGCACGATGTAGGCAGTATGTCAACGACAAAACGATGTCTATATCAA
 481 D D F A A R C R Q Y V N D K T M S I S T
 1501 CCTTCTCATAAGTAGAGTCGTTTCGCAGGTTGCCATCTTTAGTGACGTTTGCGAATACTT
 501 F F I S R V V R R L P S L V T F A N T L
 1561 TGTTTATAACGAGCTTATTTGTCAGCATCGTTTTCAATTTTACAGAGTATTATTTTGGAAC
 521 F I T S L F V S I V S I L Q S I I L E H
 1621 ATCGAATGTACAAGCAGCAGGTCTTACAAATGAAACTGGAGAGCGATGAACGAGTGTGTA
 541 R M Y K Q Q V L Q M K L E S D E R V C I
 1681 TCGAGTTGTACGCTAGCTTGCAAGCAAAGTTGGGACGAACTTTCACGTGGGAAGAGTTCA
 561 E L Y A S L Q A K L G R T F T W E E F I
 1741 TAGAGTATTTACAAACGGTGAACCCCAATATCGTAGCATTGCTGAGGCTCAAATGGCAC
 581 E Y L Q T V N P N I V A F A E A Q M A Q

6K1

1801 AGCATATCGTGGAACATCAGCAATCGACAACCTGGAGTGAAAAATTTAGAACAAGTGGTCG
 601 H I **V E H Q /Q** S T T G V K N L E Q V V A
 1861 CTTTCATAACTCTTGTGATGATGGTGTTCGATAGCGAAAGGAGTGAAGTGTGTTTTTAAAA
 621 F I T L V M M V F D S E R S D C V F K T

CI

1921 CATTAAATAAACTCAAAGGTGTCGTTTCAACCCTTGATTACGGCGTTAGGCACCAATCAC
 641 L N K L K G V V S T L D Y G **V R H Q /S** L

1981 TCGATGATTTTGTAGAAAACCTTCGACGAGCGCAATCAAACAGTCGACTTTGAGCTTGATG
 661 D D F V E N F D E R N Q T V D F E L D D

2041 ACGATATTGCACAGAATCAAATGCGTTAGATATCAAGTTTACAGACTGGTGGGATAAGC
 681 D I A Q N Q N A L D I K F T D W W D K Q

2101 AAGTGCAGTCAGGCTTCACAATTCCTCACTACCGGACTGAAGGGTATTTTCATCGAATTCA
 701 V Q S G F T I P H Y R T E G Y F I E F T

2161 CAAGAGCAACTGCAGCTCAGGTTGCCAGTGATATTGCACAGAGTGAACACTTAGACTTTC
 721 R A T A A Q V A S D I A Q S E H L D F L

2221 TCATCCGGGGAGCTGTAGGATCTGGGAAATCAACAGGGTTGCCAACACAACACTCAGTCAGA
 741 I R G A V G S G K S T G L P T Q L S Q T

2281 CAGGAACAGTTTTATTACTCGAACCAACTAGACCACTAGCGGAAAACGTTTTTAAACAGT
 761 G T V L L L E P T R P L A E N V F K Q L

2341 TGTCGAGTAGTCCATTCTTTCAAAAACCAACTCCGCATGAGGGGAAGTAGTGTTCG
 781 S S S P F F Q K P T L R M R G S S V F G

2401 GGTCTCCCAATCTCGATTATGACGAGTGGATTTCGCTTTGCATTACTTCGCTCATAACA
 801 S S P I S I M T S G F A L H Y F A H N R

2461 GAACACAATTGGCTAGCTATGATTATGTGATCATTGATGAGTGCCATGTTATGGATTCCA
 821 T Q L A S Y D Y V I I D E C H V M D S S

2521 GTGCCATGGCATTTCGTGGTTTGTGAGCTTGCATCACAAAGCGTGTAAGTTTTGAAAG
 841 A M A F R G L L S L H H K A C K V L K V

2581 TTTTCAGCAACTCCACCAGGCAGAGAGGTTGAATTCACAACACTCAGTATCCAGTGAATTAG
 861 S A T P P G R E V E F T T Q Y P V K L V

2641 TAATCGAGGATAATCTCTCATTCAAATCTTTTGTGGAAGCACAAGGAACCTGGTAGCAATG
 881 I E D N L S F K S F V E A Q G T G S N A

2701 CCGACATGATCAAACACGGACACAACATACTGGTCTACGTCGCAAGTTACAATGAAGTTG
 901 D M I K H G H N I L V Y V A S Y N E V D

2761 ACTCTTTATCCAAGATGTTGACGGATAAAAACATGATGGTAACAAAAGTAGATGGGAGAA
 921 S L S K M L T D K N M M V T K V D G R T

2821 CAATGAAACATGGGAGTCTCGAAATTGTCCTAGAGGAACTCAAGAAAAAGCACATTTCA
 941 M K H G S L E I V T R G T Q E K A H F I

2881 TAGTCGCTACCAACATAATCGAGAATGGTGTTACGTTAGACATTGATGTGGTTGTTGACT
 961 V A T N I I E N G V T L D I D V V V D F

2941 TTGGAGTGAAGGTATCTCCTTTCTTGGACATTGACAATAGAAGTGTAGCATATAATAAAG
 981 G V K V S P F L D I D N R S V A Y N K V

3001 TCAGTGTGAGTTATGGAGAACGAATTCAACGGCTAGGACGAGTTGGGCGGTTAAGCCAG
 1001 S V S Y G E R I Q R L G R V G R V K P G

3061 GTGTTGCATTGAGAATCGGACATACTGAGAAGGGACTGATCGAAATACCAAGTATGATTG
 1021 V A L R I G H T E K G L I E I P S M I A

 3121 CAACAGAAGCTGCTCTAGCCTGCTTTGCTTACAACCTGCCAGTGATGTCCAGCAATGTTT
 1041 T E A A L A C F A Y N L P V M S S N V S

 3181 CTACAAGTATCATAAGCAACTGCACTGTCCGACAAGTTAAAACAATGCATCAATTTGAGT
 1061 T S I I S N C T V R Q V K T M H Q F E L

 3241 TGAGCCCTTTCTTTGTGTACAATTTTGTGCGCACACGATGGAACGATGCATCCAGAGATTG
 1081 S P F F V Y N F V A H D G T M H P E I H

 3301 ACAAGATTCTTAACAAGTACAAGTTACGGGATTCAATCACACCTCTGTGTGAGCAGTCGG
 1101 K I L N K Y K L R D S I T P L C E Q S V

 3361 TACCATATCGAGCTTCAAGCAGTTGGTTAACTGTCTCAGAATACGAGAGGATGGGGATAG
 1121 P Y R A S S S W L T V S E Y E R M G I V

 3421 TTTTGTATCTACCACAACAGACAAAAATTGCCTTCCATATTCGAGATGTTCCACCAAAAC
 1141 F D L P Q Q T K I A F H I R D V P P K L

 3481 TGCACGAATCACTTTGGAACACCGTGGAAAAATTTAAGGATGTGTCGATTTTTCCAAGCA
 1161 H E S L W N T V E K F K D V S I F P S I

 3541 TTCGTTCTGCTTCAATAAGCAAAATTGCATATACTCTGAGTACAGACCTGTTTGCGATTG
 1181 R S A S I S K I A Y T L S T D L F A I P

 3601 CAAGAACACTCATTTTTGTGGACAGGCTGATTGAAGAGGAACGAACTAAACAGAGTCAGT
 1201 R T L I F V D R L I E E E R T K Q S Q F

 3661 TCCGTAGCTACATTGATAGTGGTTGCTCTAGTATGTTTTCGATTTTAACTTGACAAATA
 1221 R S Y I D S G C S S M F S I L N L T N T

 3721 CTTTACGCTCCAAATACGCGAAAGATTACACAACAGAAAACATTCAGAACTGGAGCGAG
 1241 L R S K Y A K D Y T T E N I Q K L E R V

 3781 TTAGGAATCAATTGAAAAGAATTTATAACCTCGGTGGTTTCGGCTGACGAGCACAACCTGA
 1261 R N Q L K E F H N L G G S A D E H N L I

6K2

3841 TAAAGCGGTTTGAGTCGCTTCAGTACGTGCACCACCAGTCAAAGATGCTCTTTCAAAAG
 1281 K R F E S L Q Y **V H H Q /S** K D A L S K D

 3901 ATCTCAAACCTAAAGGTATCTGGAATAAGTCATTAATCGTTAAAGACGTCTTAGTGGCGG
 1301 L K L K G I W N K S L I V K D V L V A G

 3961 GTGCAGTAGCTATTGGTGGCGTTTACTTGTGTATAGTTGGTTCACTAACTCAATGCAAT
 1321 A V A I G G V Y L L Y S W F T N S M Q S

VPg

4021 CTGTTTTCGCATCAAGGGAAAAACAAAGGCAAAAAGAATTCAGCACTCAAGTTCAGAAGGG
 1341 **V S H Q /G** K T K A K R I Q A L K F R R A

4081 CCAGAGATAAGCGAGCGGGTTTTGAGCTCGATAATAACGATGACACAATTGAAGAATTCT
 1361 R D K R A G F E L D N N D D T I E E F F

 4141 TTGGATCCGCGTACAGAGAGAAGGGCAAGAAGAAAGGGACAACAGTTGGCATGGGAAAAAT
 1381 G S A Y R E K G K K K G T T V G M G K S

 4201 CAAATAGACGATTTATCAACATGTATGGTTTTCGAACCAGGGGAGTTTTCATACATTTCAGT
 1401 N R R F I N M Y G F E P G E F S Y I Q F

 4261 TTGTGGACCCCTTGACTGGTGCTCAAATTGAAGAAAATGTTTATGCTGATATCTTGGATG
 1421 V D P L T G A Q I E E N V Y A D I L D V

 4321 TTCAGGAACGTTTTGGTGATATCAGACGCAAGCTGATAGAGGAAGATGAGTTAGATCCAC
 1441 Q E R F G D I R R K L I E E D E L D P Q

 4381 AATTGACATATACAAATACAGCGATTCATGCGTATTTAAGGAAAGACTGGTCGAATAAAG
 1461 L T Y T N T A I H A Y L R K D W S N K A

 4441 CCCTCAAAGTCGATTTACTGCCACACAATCCGTTGAAAATATGCGACAAGACAAATGGAA
 1481 L K V D L L P H N P L K I C D K T N G I

 4501 TCGCAAAGTTTCCAGAACGAAAAGGCGAGCTTCGCCAAACTGGCGGCGCAGTTGAGGTGG
 1501 A K F P E R K G E L R Q T G G A V E V D

Nla-Pro

4561 ATGTTGAGGATATTCCAAAAGTGAAGGTTGAACACGAATCGAAGTCCTTAATGAGGGGTT
 1521 V E D I P K V K **V E H E /S** K S L M R G L

 4621 TGAGGGATTACAACCCAATAGCGCAGACAGTTTGCAGGTTGAAGGCAAAAACAGAGCATG
 1541 R D Y N P I A Q T V C R L K A K T E H G

 4681 GTGTTTCGGAGATGTTTCGGAATTGGCTTTGGAGCGTACATCATCAGAACACCATTCT
 1561 V S E M F G I G F G A Y I I T N H H F L

 4741 TGAAGAGTTTTAATGGTACGCTTGAGGTTGCTCGCATCACGGAATTTTCAAAGTCACAA
 1581 K S F N G T L E V R S H H G I F K V T N

 4801 ATATGATGAGCTTGCAAGTGAAACCAATTACAGGACGTGACATTGTCATTATAAAGATGC
 1601 M M S L Q V K P I T G R D I V I I K M P

 4861 CAAAAGACTTTCCAGTATTCCTCAGAGAATACATTTTAGAGCACCAAACAGAAACGAAC
 1621 K D F P V F P Q R I H F R A P N R N E R

 4921 GCATTTGTTTAGTCGGAACAAACTTTCAAGAGAAGTCAGTGTCTTCAACAGTTACTGAGA
 1641 I C L V G T N F Q E K S V S S T V T E T

 4981 CGAGTGCAACTTACGCCGTTCCACGAAGCACGTTCTGGAAACATTGGATAGCAACAGATG
 1661 S A T Y A V P R S T F W K H W I A T D D

 5041 ATGGGCATTGTGGTTTACCAGTAGTTAGTACGCTTGATGGAAACATCATTGGTCTTCACA
 1681 G H C G L P V V S T L D G N I I G L H S

5101 GTCTTGCAAACAATTCAACGAGCGAGAATTATTATGCTGCTTTTCGATGAGGAATTTGAAC
 1701 L A N N S T S E N Y Y A A F D E E F E P

5161 CCAAGTACTTACGAAACGCAGAACATGGTGAGTGGGTGAAGAATTGGAGATAACAATCCTG
 1721 K Y L R N A E H G E W V K N W R Y N P D

5221 ATACAGTTGTTTGGGGTTCCTTGGAGTTGAAGCAGAGCACACCATCGGGATTATTTAAAA
 1741 T V V W G S L E L K Q S T P S G L F K T

N1b

5281 CCACTAAGATTATTGAGGACTTGATGAATCATAACACAGTGAGAGAGCAATCGAAAAGCT
 1761 T K I I E D L M N H N T **V R E Q /S** K S S

5341 CAACATGGATGTTTGGATGCTTTGAAGGATGGTTTACAGGCTGTTGGTTACATGAAAAACC
 1781 T W M F D A L K D G L Q A V G Y M K N Q

5401 AACTGGTTACGAAACATGTTGTGAAGGGAGAGTGTAGGCACTTCAAAGAATTCCTCACAA
 1801 L V T K H V V K G E C R H F K E F L T I

5461 TTGATCAAGAAGCATCTGATTACTTCAGGCCACTGATGGACGCTTATGGAAAGAGTCTCT
 1821 D Q E A S D Y F R P L M D A Y G K S L L

5521 TAAATCGTGAAGCATAACATAAAAGACATAATGAAATATTCAGAACCAATTGAGATTGGAG
 1841 N R E A Y I K D I M K Y S E P I E I G V

5581 TTGTGGATTGTGATGCTTTTGAAGAGGCAACTGCGCGGTTATACTTTATTTGCAAATGA
 1861 V D C D A F E E A T A R V I L Y L Q M K

5641 AAGGATTCCGTCAGTGCTCCTTCATAACAGATGAGCAAGAGATTTTTAAGGCGTTAAATA
 1881 G F R Q C S F I T D E Q E I F K A L N M

5701 TGAAAGCAGCAGTTGGAGCCATGTATGGTGGAAAGAAGAAAGAATACTTTGAGAACTTTT
 1901 K A A V G A M Y G G K K K E Y F E N F S

5761 CGGACGAAGACAAAGAGGCAATAGTCATGCAAAGTTGCTTACGACTGTACAAGGGACAAA
 1921 D E D K E A I V M Q S C L R L Y K G Q I

5821 TCGGAGTTTGAATGGGTCTCTAAAAGCAGAACTGCGGTGCAAAGAGAAAATTCTTGCGA
 1941 G V W N G S L K A E L R C K E K I L A N

5881 ACAAGACACGCACGTTTACTGCAGCACCATTAGATACACTTCTGGGTGGAAAGGTTTGTG
 1961 K T R T F T A A P L D T L L G G K V C V

5941 TTGACGATTCAACAACCAGTTTTACTCAAAGAACATTGAGTGTGTTGGACTGTTGGAA
 1981 D D F N N Q F Y S K N I E C C W T V G M

6001 TGACCAAGTTTTATGGCGGATGGAATAGATTGCTCAGAAGCCTACCTGATGGTTGGATTT
 2001 T K F Y G G W N R L L R S L P D G W I Y

6061 ATTGTGATGCAGACGGATCACGATTTGACAGTTCTTTAACTCCATATTTAATAAATGCAG
 2021 C D A D G S R F D S S L T P Y L I N A V

6121 TGTTGTCGATTTCGTAGTACATACATGGAAGATTGGGACATTGGTTTACAAATGTTAAAGA
 2041 L S I R S T Y M E D W D I G L Q M L K N

6181 ACTTGTTACACAGAGATAATTTACACGCCAATCGCCACACCAGACGGAACAATTGTGAAA
2061 L Y T E I I Y T P I A T P D G T I V K K

6241 AGTTTAGAGGGAACAACAGCGGTCAGCCTTCTACAGTTGTTGACAACCTCTAATGGTTG
2081 F R G N N S G Q P S T V V D N S L M V V

6301 TTCTGGCCATGCACTACGCGTTTGTGAGGGAAAATATAACATTTGATGACATTGACAAC
2101 L A M H Y A F V R E N I T F D D I D N C

6361 GCTGCAAATTCCTTGTCAATGGTGACGACCTCCTAATTGCCATCAATCCCGAAAAGGAAC
2121 C K F F V N G D D L L I A I N P E K E H

6421 ACATGCTTGACAAATTCGCTTCTCATTTTTTGAATCTTGGCTTGAACCTACGATTTTTCT
2141 M L D K F A S H F S N L G L N Y D F S S

6481 CTAGAACGAGAAACAAAGAGGAATTGTGGTTTATGTCACATAGAGGTTTGGAAATAGAAG
2161 R T R N K E E L W F M S H R G L E I E G

6541 GAATGTATATTCCAAAGCTAGAAGAGGAAAGAGTTGTCTCAATCTTACAATGGGATCGAG
2181 M Y I P K L E E E R V V S I L Q W D R A

6601 CTGAGTTGCCGGAACATAGACTGGAAGCGATTTGTGCTGCAATGATTGAAGCGTGGGGCT
2201 E L P E H R L E A I C A A M I E A W G Y

6661 ATCCTGAATTGATACATCAAATACGCAGATTCTATTCATGGTTGCTTGAACAACAACCTT
2221 P E L I H Q I R R F Y S W L L E Q Q P F

6721 TTGCTACACTAGCTCAAGAAGGAAAGGCACCATAACATTGCGAGTATGGCTCTGCGTCGAT
2241 A T L A Q E G K A P Y I A S M A L R R L

6781 TGTATATGGATAGAATGGTAGACGAAGATGAGTTACATGAGTTCACAAAGCTGTTTTGTG
2261 Y M D R M V D E D E L H E F T K L F C D

CP

6841 ACTTGGACGAAGAGTTTGTGAGTGTGGGTGTTATGAAGTGCATCACCAGGTGGATGAAACAC
2281 L D E E F E C G C Y E **V H H Q /V** D E T L

6901 TGGATGCAGGAAAGGATAAAGCAAAGGAAAACAAAGATAAACAAGTTTCAAATCCTGCAA
2301 D A G K D K A K E N K D K Q V S N P A T

6961 CTGGTGGATTAGCGAAAGCTAAAGATGTGAATGCTGGAGCTTCAGGGACGCACACAGTAC
2321 G G L A K A K D V N A G A S G T H T V P

7021 CTCGGATAAAAAGCAATAACATCAAAGATGCGAATGCCTAAGTCGAAAGGAGCTGTTGCTC
2341 R I K A I T S K M R M P K S K G A V A L

7081 TCAACTGAATCATTGTTAGAGTACACACCCCAGCAAGTAGATATATCAAACACACGTG
2361 N L N H L L E Y T P Q Q V D I S N T R A

7141 CCACTCAAGCTCAATTTGACACGTGGTATGAGGCAGTTCGCACGGCATAACGACATCAGTG
2381 T Q A Q F D T W Y E A V R T A Y D I S E

7201 AAACGGAAATGCCGACAGTGATGAATGGATTGATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCT
2401 T E M P T V M N G L M V W C I E N G T S

7261 CGCCAAATATAAATGGAGTTTGGGTGATGATGGAAGGACAAGAACAGATTGAATCCCGC
2421 P N I N G V W V M M E G Q E Q I E F P L

7321 TCAAACCAATTATTGAAAATGCAAACCAACATTCAGACAGATCATGGCACACTTCTCTG
2441 K P I I E N A K P T F R Q I M A H F S D

7381 ATGTGGCAGAAAGCGTATATTGAGATGCGCAACAAGAAAGAACCGTATATGCCACGATACG
2461 V A E A Y I E M R N K K E P Y M P R Y G

7441 GTTTGGTCAGAAATTTACGTGACATGAGCTTAGCACGCTATGCTTTTTGATTTCTACGAAG
2481 L V R N L R D M S L A R Y A F D F Y E V

7501 TCACGTCTCATAACATCAGTTTCGCGCTCGTGAAGCACACATCCAGATGAAGGCAGCAGCTT
2501 T S H T S V R A R E A H I Q M K A A A L

7561 TAAAATCATCGCAAACAAGGATGTTTCGGATTAGATGGTGGCATTGGTACACAGACGGAAA
2521 K S S Q T R M F G L D G G I G T Q T E N

7621 ACACAGAAAGACACACCACCGAGGATGTGAGTCCTAACATGCATACTTTGCTTGGGGTTC
2541 T E R H T T E D V S P N M H T L L G V R

7681 GGAACATGTGATTGTGTTTTAACTGGGATGAAATATAAGTATATATCGTATGCAATATAT
2561 N M

7741 ATTTTGGCTTTTCCTGTACTTCTTTAATTACGACTTTACAGTATTGTGATCTAAGGCAAC

7801 GTAAGGTGGCTTGTAGATTCTGTCTTCAAGGTGACTTGC GTTTCCGTTTCTATCTGTTCT

7861 AGTTTATGTTAAAGTTCCGGGTGGCTTGC GTTGGTGTGTTGCGATTTTCGTCGTAGCAGT

7921 GACATTAAGCTTGACATCAGGAGAC


```

BIMVpAY960150 QIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDMSLARYAFDFYEVTSHTSVRAREAH 216
BIMVbAY960151 QIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDMSLARYAFDFYEVTSHTSVRAREAH 216
BIMVSP QIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDMSLARYAFDFYEVTSHTSVRAREAH 216
BiMV13 QIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDMSLARYAFDFYEVTSHTSVRAREAH 216
PepSMVX66027 QIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDMSLARYAFDFYEVTSHTSVRAREAH 218
PepymvAF348610 QIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDMSLARYAFDFYEVTSHTSVRAREAH 224
LMVAF199AJ278854 QIMAHFSDAAEAYIEMRNKKEPYMPRYGRLRGLNDMGLARYAFDFYETTSATPNRAREAH 226
TuMV925463 QIMAHFSDVAEAYIEKRNQDRPYMPRYGLQRNLTDMSLARYAFDFYEMTSRTPIRAREAH 237
*****.***** ** ...***** *. * * .***** ** *. *****

BiMoVAB491763 IQMKAALKSAQSRLFLDGGISTQQENTERHTTEDVNSDMHTLLGVRNM 265
BiMovAB491764 IQMKAALKSAQSRLFLDGGISTQQENTERHTTEDVNSDMHTLLGVRNM 265
BiMoVEU098760 IQMKAALKSAQSRLFLDGGISTQQENTERHTTEDVNSDMHTLLGVRNM 265
PVYAJ439545 IQMKAALKSAQPRFLDGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM 266
PVYSNAJ439544 IQMKAALKSAQSRLFLDGGVSTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM 266
SuCMoVEU606023 IQMKAALKSAQTRMFLDGGIGTKEENTERHTTEDVNLNMHTLLGVRNM 269
SuCMOVEU418771 IQMKAALKSAQTRMFLDGGIGTKEENTERHTTEDVNPNMHTLLGVRNM 269
SucMov IQMKAALKSAQTRMFLDGGIGTKEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 269
BIMVpAY960150 IQMKAALKSSQTRMFLDGGIGTQENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 266
BIMVbAY960151 IQMKAALKSSQTRMFLDGGIGTQENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 266
BIMVSP IQMKAALKSSQTRMFLDGGIGTQENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 266
BiMV13 IQMKAALKSSQTRMFLDGGIGTQENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 266
PepSMVX66027 IQMKAALKSVQTRMFLDGGISTQEENTERHTTEDVSPHMHTLLGVRNT 268
PepymvAF348610 IQMKAALKSAQTRMFLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVRNM 274
LMVAF199AJ278854 NQMKAAALVGTQNRFLFGMDGGSTQEENTERHTAADVQNMMHTLLGVRGL 276
TuMV925463 IQMKAALRGANNLFLDGNVGTVENTERHTTEDVNRNMHNLGKGL 287
***** . : .:*.**:*. * * *****: **. **.******:..

```

Apêndice 3. Alinhamento múltiplo utilizando o programa CLUSTAL W para a sequência de nucleotídeos da proteína capsidial entre os isolados BiMV-SP e BiMV-13 e outros Potyvirus

| | | |
|--------------|---|-----|
| PVYLYE | -----GCAA | 4 |
| PVY-SN | -----GCAA | 4 |
| SCMoV-df | -----G | 1 |
| SCMoV-CRS | -----G | 1 |
| SCMoV-AR | -----G | 1 |
| BiMVp | -----GTGG | 4 |
| BiMV-b | -----GTGG | 4 |
| BimvSP | -----GTGG | 4 |
| BiMV13 | -----GTGG | 4 |
| PepSMV | -----GCTG | 4 |
| BiMoVgc | -----GCAAAAGATG | 10 |
| BiMoVlettuce | -----GCAAAAGATG | 10 |
| BiMoVba | -----GCAAAAGATG | 10 |
| PepYMV | -----GCGGATGAGAACTAGCGGTGCTGGATG | 28 |
| LMV | -----GTAGATGCGAAGCTTGTATGCAGGCCAAG | 28 |
| TuMV | GCGGTTGAGACGCTTGACGCAGGTTAACAGATGAGCAAAGCAGGCAGAGAAGGAGAAG | 60 |
| | | |
| PVYLYE | ACGATACAATTGATGCTGGAGGGAGCAGTAAGAAAGATGCGAAACCA-----GAAC | 55 |
| PVY-SN | ATGATACAATTGATGCTGGAGAGAACAGTAAGAAAGATGCGAAACCA-----GAAC | 55 |
| SCMoV-df | GTGACAACATAGATGCAGGAAAAGAAAAGAAAGATGAGAAGAAAAGATGACAAGAATAAAC | 61 |
| SCMoV-CRS | GAGACAATTTAGATGCAGGGAAGGAAAAGAAAAGATGAGAAGAAAAGATGATAAGAATGAGC | 61 |
| SCMoV-AR | GTGACAACATAGATGCAGGAAAAGACCAGAAAAGACGAGAAGAAGGATGATAAAAACAAGC | 61 |
| BiMVp | ACGAAACATTGGATGCAGGAAAAGGATAAAGCAAAGGAAAAGCAAAGAT-----AAAC | 55 |
| BiMV-b | ACGAAACATTGGATGCAGGAAAAGGATAAAGCAAAGGAAAAGCAAAGAT-----AAAC | 55 |
| BimvSP | ATGAAACACTGGATGCAGGAAAAGGATAAAGCAAAGGAAAAGCAAAGAT-----AAAC | 55 |
| BiMV13 | ATGAAACACTGGATGCAGGAAAAGGATAAAGCAAAGGAGAACAAGGAT-----AGAC | 55 |
| PepSMV | ATACAACCTGTTGATGCTGAAAAGGAAAAGAAAAGGCGAGTTCTGGT---AAATGGAAGA | 61 |
| BiMoVgc | AAGAAAAGATCGATGCAGGAGATCCAGCAAAGAAAAGGAGCAAATT-----CCTC | 61 |
| BiMoVlettuce | AGGAAAAGATCGATGCAGGAGATCCAGCAAAGAAAAGGAGCAAATT-----CCTC | 61 |
| BiMoVba | AAGAAAAGATCGATGCAGGAGATCCAGCAAAGAAAAGGAGCAAATT-----CCTC | 61 |
| PepYMV | CGGCTGAGGAAGACAAGAAGAAGAGCTAAGAAATGAACAGCCGTTGATGCGTCAAATT | 88 |
| LMV | GCAGCAAGACTGATGATAAAACAGAAGAATTTCAGCGGATCCAAAGGATAATATCATCACGG | 88 |
| TuMV | AAGGAGAGAGAGAAGGCGAAAAGGAACGAGAGAGGCAGAAAGCAGTTGGCAC--TCAAGA | 118 |
| ** | | |
| | | |
| PVYLYE | AGGGTAGCATTAGCCAACTCCTAACAGGGAAAAGGATAAGGACGTGAATGCCGGTACAT | 115 |
| PVY-SN | AGGGTAGCATCCAGCGAAATCCTAACAGGGAAAAGGATAAGGACGTGAATGCCGGTACAT | 115 |
| SCMoV-df | AAGTCCGATCTATAGCAAGCAAGGAAATCGGTAAATCAAAGGATGTCAATGCTGGCACTT | 121 |
| SCMoV-CRS | AGGTTGCATCTACAGCAAGCAAGGAAATCGGTAAATCAAAGGATGTCAATGCTGGCACTT | 121 |
| SCMoV-AR | AAGTTGCATCCACAGCTAGTAAAGATGCTGCGAAGTCAAAGATGTCAACGCTGGCACTT | 121 |
| BiMVp | AAATTTCAAATCCTGCAACTGGTGGATTAGTGAAGCTAAAGATGTGAATGCTGGGGCTT | 115 |
| BiMV-b | AAATTTCAAATCCTGCAACTGGTGGATTAGTGAAGCTAAAGATGTGAATGCTGGGAGCTT | 115 |
| BimvSP | AAGTTTCAAATCCTGCAACTGGTGGATTAGTGAAGCTAAAGATGTGAATGCTGGGAGCTT | 115 |
| BiMV13 | AAATTTCAAATCCTGCAACTAGTGGAAATAGCGAAAGCTAAAGATGTGAATGCTGGGAGCTT | 115 |
| PepSMV | AAGTTGAGGGTCTGCTGACAGCTGAAAGCAACTGATAAGGATGTGAACGCCGGAACCTA | 121 |
| BiMoVgc | CTCCTGAGAATAAAGCAATAACCAA---GGGAAAAGACAAGGATATCAATGCAGGAACCTT | 118 |
| BiMoVlettuce | CTCCTGAGAATAAAGCAATAACCAA---GGGAAAAGACAAGGATATCAATGCAGGAACCTT | 118 |
| BiMoVba | CTCCTGAGAACAAGCAATAACCAA---AGGAAAAGACAAGGATATCAATGCAGGAACCTT | 118 |
| PepYMV | TGAAAGGAAAAGGAGAAAGGAGTGTCTACATCCAGGGACAATGATGTAACACTTGAACAAA | 148 |
| LMV | AGAAAGGAAGTGGTTCTGGGCAGGT---GAAGAAGGATGACGACATCAACGCAGGGCTAC | 145 |
| TuMV | AAGGCAAGGATGTCGCACAAGAAGAGGGAAAACGCGATAAGGAAGTAAACGCTGGAACTT | 178 |
| * * * * * | | |
| | | |
| PVYLYE | CTGGAACACATACTGTACCAAGAATAAAGGCTATTACGTCAAAAATGAGAATGCCTAAAA | 175 |
| PVY-SN | CTGGAACACATACTGTGCCAAGAATAAAGGCTATCACGTCAAAAATGAGAATGCCTAAAA | 175 |
| SCMoV-df | CAGGAACACACACAGTACCCCGAATTAAGGATTAACACTCAAAAATGCGCATGCCAAAAAT | 181 |
| SCMoV-CRS | CAGGAACACACACAGTACCCCGAATTAAGGATTAACACTCAAAAATGCGAATGCCAAAAAT | 181 |
| SCMoV-AR | CAGGAACACACCAATACCCCGTATCAAAAAGCATAAACACCAAAAGATGAGAATGCCAAAAAT | 181 |
| BiMVp | CAGGGACGCATACAGTACCTCGGATAAAGCAATAACATCAAAAATGCGAATGCCTAAGT | 175 |
| BiMV-b | CGGGGACGCATACAGTACCTCGGATAAAGCAATAACATCAAAAATGCGAATGCCTAAGT | 175 |
| BimvSP | CAGGGACGCACACAGTACCTCGGATAAAGCAATAACATCAAAAATGCGAATGCCTAAGT | 175 |
| BiMV13 | CAGGGACGCATACAGTACCTCGAATAAAGCAATAACATCAAAAATGCGAATGCCTAAGT | 175 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| PepSMV | TCGGAACCCACACTATCCCTCGGATCAAGGCGATTACGGGGAAAAATGAGGCTGCCTAAAT | 181 |
| BiMoVgc | CAGGAACAATGACAGTGCCACGTATTAAGCTATAACAACCAAAAATGCGTTTGCCGAAGG | 178 |
| BiMoVlettuce | CAGGAACAATGACAGTGCCACGTATTAAGCTATAACAACCAAAAATGCGTTTGCCGAAGG | 178 |
| BiMoVba | CAGGAACAATGACAGTGCCACGTATTAAGCTATAACAACCGAGATGCGCTTGCCGAAAG | 178 |
| PepYMV | CTGGGACTTTTACAGTACCAAGAATCAAAGCAATAACGAGTAAGATGAGGATGCCGAAAG | 208 |
| LMV | ATGGTAAACACACCATACTCGTACAAAGGCAATCACACAGAAAATGAAGTTACCAATGA | 205 |
| TuMV | CTGGAACCTTTCAGTGTACCCAGACTTAAGAGTTTGACAAGCAAGATGCGCGTGCCAAGAT | 238 |
| | * * * * * * * * * * * * * * | |
| PVYLYE | GCAAAGGAGTGCCGCGACTAAACTTAGAACACTTGCTCGAGTACACTCCACAACAGATAG | 235 |
| PVY-SN | GCAAAGGAACAGCCGTGCTAAACTTAGAACATTTGCTCGAATATGCTCCACAACAGATAG | 235 |
| SCMoV-df | CCAAGGGTGCTATCGCTTTAAATTTAGCCCACTTACTCGAGTATACTCCACAGCAAGTTG | 241 |
| SCMoV-CRS | CCAAGGGTGCTGTCGCTTTAAATTTGGCCCACTTACTCGAGTATACTCCACAGCAAGTTG | 241 |
| SCMoV-AR | CAAAGGGTGCTATAGTTTGAATCTAGATCATTTGCTCGAGTACACTCCACAACAGGTTG | 241 |
| BiMVp | CGAAAGGAGTTGTCGCTCTCAACTTAAATCATTTGTTAGAGTACACACCCAGCAAGTTG | 235 |
| BiMV-b | CGAAAGGAGTTGTCGCTCTCAACTTGAATCATTTGTTAGAATACACACCCAGCAAGTTG | 235 |
| BimvSP | CGAAAGGAGCTTGTGCTCTCAACTTGAATCATTTGTTAGAGTACACACCCAGCAAGTAG | 235 |
| BiMV13 | CGAAAGGAGTTGTCGCTCTCAACTTAAATCATTTGTTAGAGTACACACCCAGCAAGTTG | 235 |
| PepSMV | CTAAAGGGAAGACTGCTTTGAATCTGGATCACTTGTGAGTACGAACCACAACAGATAG | 241 |
| BiMoVgc | CCAGAGGGTCAAGTTGCTTAACTTGGACCAAGTTACTGGAGTATCGACCTCAACAAGTAG | 238 |
| BiMoVlettuce | CCAGAGGGTCAAGTTGCTTAACTTGGACCAAGTTACTGGAGTATCGACCTCAACAAGTAG | 238 |
| BiMoVba | CTAGAGGGTCAAGTTATCCTTAACTTGGACCAAGTTGCTGGAGTATCGACCTCAACAAGTAG | 238 |
| PepYMV | TAGGCGGCACCACGATTTTAAATCTGGATCATTTACTCACATATACACCTCAACAGATAG | 268 |
| LMV | TCCGAGGTAAAGTGGCTTTAAACCTTGATCATTTGCTGGAGTACGAACCAACAGAGAG | 265 |
| TuMV | ACGAACAAAGAGTGGCTTTAAACCTCGATCATCTAATCCTATACACGCGGAGCAGACGG | 298 |
| | * * * * * * * * * * * * * * | |
| PVYLYE | ATATCTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTGCGGA | 295 |
| PVY-SN | ATATCTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTGCGGG | 295 |
| SCMoV-df | ATATTTCAAATACTCGAGCTACTCAATCACAAATTCGATACTTGGTATGCAGCAGTTC AAC | 301 |
| SCMoV-CRS | ATATCTCAAATACTCGGGCCACTCAATCACAAATTTGATACTTGGTATGCAGCAGTTC AAC | 301 |
| SCMoV-AR | ACATATCAAATACTCGGCAACTCAATCTCAATTTGATACTTGGTATGCAGCAGTTC AAC | 301 |
| BiMVp | ATATATCAAACACACAGTGCCTCAAACTCAATTTGACACGTGGTATGAGGCAGTTCGCA | 295 |
| BiMV-b | ATATATCAAACACACAGTGCCTCAAACTCAATTTGACACGTGGTATGAGGCAGTTCGCA | 295 |
| BimvSP | ATATATCAAACACACAGTGCCTCAAGCTCAATTTGACACGTGGTATGAGGCAGTTCGCA | 295 |
| BiMV13 | ATATATCGAACACACAGTGCCTCAAACTCAATTTGACACGTGGTATGAGGCAGTTCGCA | 295 |
| PepSMV | ATATATCTAAACTCGAGCAACTCAGTACAAATTTGATACATGGTTTAAAGCAGTTC AAA | 301 |
| BiMoVgc | ATTTGTCAAACACTCGAGCAACGCAAGAAACAATTCAGTCTGTGGTACGAGTATGTTAAGA | 298 |
| BiMoVlettuce | ATTTGTCAAACACTCGAGCAACGCAAGAAACAATTCAGTCTGTGGTACGAGTATGTTAAGA | 298 |
| BiMoVba | ATTTGTCAAACACTCGAGCAACGCAAGAAACAATTCAGTCTGTGGTACGAGTATGTTAAGA | 298 |
| PepYMV | ACATTTCAAACACAAGATCTACGCACAGCCAATTCGATAATTTGGTATGCTGCAGTTAAA | 328 |
| LMV | ACATATCGAACACACAGTGCACCCAGAAACAGTACGAGTATGTTGATGACGCGGGTTAAGA | 325 |
| TuMV | ATCTATCCAACACACAGTTCACCGGAAAGCAGTTTGACACATGGTTTGAAGTGTGATGG | 358 |
| | * * * * * * * * * * * * * * | |
| PVYLYE | TGGCATAACGACATAGGGGAAACTGAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGT | 355 |
| PVY-SN | TGGCATAACGACATAGGGGAAACTGAAATGCCAAGTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGT | 355 |
| SCMoV-df | AAGCATAACGACATCAGCGAAAAGTGAGATGCCAACAGTGTGATGAATGGACTTATGGTTTGGT | 361 |
| SCMoV-CRS | AAGCATAACGACATCAGCGAAAAGTGAGATGCCAACAGTGTGATGAACGGACTTATGGTTTGGT | 361 |
| SCMoV-AR | AAGCATAACGACATCAGTGAGAGCGAGATGCCGACAGTGTGATGAATGGACTTATGGTTTGGT | 361 |
| BiMVp | CGGCATAACGACATCAGTGAACAGAAAATGCCGACAGTAATGAATGGATTGATGGTTTGGT | 355 |
| BiMV-b | CGGCATAACGACATCAGTGAACAGAAAATGCCGACAGTAATGAATGGATTGATGGTTTGGT | 355 |
| BimvSP | CGGCATAACGACATCAGTGAACAGAAAATGCCGACAGTGTGATGAATGGATTGATGGTTTGGT | 355 |
| BiMV13 | CGGCATAACGACATCAGTGAACAGAAAATGCCGACAGTGTGATGAATGGATTGATGGTTTGGT | 355 |
| PepSMV | CAGCATAACGACATCACTGAAGATGAAATGCCACAGTGTGATGAATGGATTGATGGTTTGGT | 361 |
| BiMoVgc | ACTCGTATGATGTCTCCGATACTGAAATGGCAACACTCATGAATGGATTAAATGGTGTGGT | 358 |
| BiMoVlettuce | ACTCGTATGATGTCTCCGATACTGAAATGGCAACACTCATGAATGGACTAATGGTGTGGT | 358 |
| BiMoVba | ACTCGTATGATGTCTCCGATACTGAAATGGCAACACTCATGAACGGACTAATGGTGTGGT | 358 |
| PepYMV | ATGTTTATGATGTTGGAGACGCTGAGATGCAAACCATTAATGAATGGATTAAATGGTTTGGT | 388 |
| LMV | ATGACTATGATGTGGACGATAATGGCATGCAATTAATTCGAATGGACTGATGGTTTGGT | 385 |
| TuMV | CTGATTACGAACCTAACGGAGGACAAAATGCAAATCATTTCAATGGTTTAAATGGTCTGGT | 418 |
| | * * * * * * * * * * * * * * | |
| PVYLYE | GCATTGAAAATGGGACCTCGCCAAAATATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGAAAATG | 415 |
| PVY-SN | GCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAAGTG | 415 |
| SCMoV-df | GCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAAATTAATGGGACTTGGGTGATGATGGAAGGAAGTG | 421 |
| SCMoV-CRS | GCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAAATTAATGGGACTTGGGTGATGATGGAAGGAAGTG | 421 |
| SCMoV-AR | GCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAAATTAACGGCACTTGGGTGATGATGGAAGGAAGTG | 421 |
| BiMVp | GCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAAATATAAATGGAGTTTGGGTGATGATGGAAGGACAA | 415 |
| BiMV-b | GCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAAATATAAATGGAGTTTGGGTGATGATGGAAGGACAA | 415 |

Apêndice 4. Alinhamento múltiplo utilizando o programa CLUSTAL W para a sequência de nucleotídeos da HC-Pro entre os isolados BiMV-SP e outros isolados de PVY.

```

PVYLYE      AGCGGTTTTTCTCAAACCTCTTTGAGGAAGTTGATCCATCAAAGGGATATTCAGCATATG 60
PVYSN      AGCGGTTTTTCTCAAACCTCTTCGAGGAAGTTGATCCAGCAAAGGGATACTCAGCATATG 60
BiMVsp     GCCGATTTTTCTCGAATTCTTTGAAGAAGTTGATCCATCAAAGGATATGGCGCATACG 60
           ** ***** ** ***** ** ***** ***** ** * ** * ** * ** *
PVYLYE      AAGTCCGCAAGCATCCGAATGGAACAAGGAAGCTCGCAATTGGTAATTTAGTTGTCCAC 120
PVYSN      AAATCCGCAAACATCCAATGGAAGTAGGAAGCTTTCAATTGGCAACTTAGTTGTCCAC 120
BiMVsp     AAATTAGAAAGAATCCCAATGGTGTGCGTAAATTGGCAATTGGAAATCTCATAGTGCCCT 120
           ** * * * * * ** * ** * * * ** * * * ** * ** * * * * *
PVYLYE      TTGATTTAGCTGAGTTTAGGCAGAAGATGAAGGGAGATTATAGGAAGCAACCAGGAGTCA 180
PVYSN      TTGATCTAGCTGAGTTTAGGCAGAGGATGAAAGGTGACTATAGGAACAACCAGGAGTCA 180
BiMVsp     TTGACTTATCAGAATCCGACTGAAATGAAAGGAGATTCATCAAACAACCAGACATTA 180
           **** ** * * * * * * * * * * ** * * * * * * * * * * * *
PVYLYE      GCAAAAAGTGCACGAGTTCGAAAGATGGTAATTATGTGTATCCCTGCTGTTGCACAACAC 240
PVYSN      GCAAAAAGTGCACAAGTTCGAAAGATGGTAATTATGTATATCCTTGCTGTTGCACAACAC 240
BiMVsp     GCAACAATGTGTAAGTCTAAAAGATGGTAATTACGTTTACCCGTGTTGTTGCACCACAC 240
           ***** ** * * * * * ***** ***** ** * * * * * ***** ** *
PVYLYE      TTGACGATGGCTCAGCCATTGAATCCACATTCTATCCGCCAACTAAAAGCACCTTGTA 300
PVYSN      TTGATGACGGCTCAGCCATTGAATCAACATTCTATCCGCCAACAAAAAGCACCTTGTA 300
BiMVsp     TTGATGATGGCAGCGCCGTGGAATCAACATTGTATCCACCACAAAGAAGCATATGGTAA 300
           **** ** * * * * * * * * * * ** * * * * * ** * * * * * ** *
PVYLYE      TAGGCAATAGTGGTGACCAAAAATATGTTGATTACCAAAAAGGTGATTCAGAGATGTTAT 360
PVYSN      TAGGCAATAGTGGTGACCAAAAATATGTTGATTACCAAAAAGGGGATTCAGAGATGTTAT 360
BiMVsp     TTGGCAACAGTGGTGAACAGAAGTATGTTGACTTACCAAAAAGGCGACTCAGAGATGCTT 360
           * ***** ***** * * * ***** ***** ***** ** * * * * * *
PVYLYE      ACATCGCCAAGCAAGGTTATTGTACATTAACATATTTCTTGAATGCTGATTAATGTTA 420
PVYSN      ACATCGCCAAGCAAGGTTATTGTATATCAACGTGTTTCTTGAATGCTGATTAACGTTA 420
BiMVsp     ATATTGCAAAACAAGGATACTGCTATATAAACATATATCTGGCCATGCTGATAAACGTGA 420
           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PVYLYE      GCGAGGAGGATGCAAAGGACTTCACAAAGAAAGTTCGCGACATGTTGTGCGCAAGCTTG 480
PVYSN      GCGAGGAAGACGCAAAGGATTTACAAAGAAAGTTCGCGACATGTTGTGCGCAAGCTTG 480
BiMVsp     ATGAAGAGGATGCGAAAGATTTACGAAGAAAGTTCGTGACATGTTGCGTTCCAAAATTAG 480
           ** * * * * * * * * * * ***** ***** ***** ** * * * * *
PVYLYE      GAACCTGGCCAACATAATGGATTGGCGACCACTTGTGCTCAAATGAGGATATTTCTATC 540
PVYSN      GAACCTGGCCAACCATGATGGACTTGGCAACCACCTGTGCTCAAATGAGAATTTTCTACC 540
BiMVsp     GGAATGGCCATCGCTTATGGATGTAGCAACAACCTGCGCTCAGTTAAGAATATTTTACC 540
           * ***** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PVYLYE      CTGATGTGCATGATGCAGAAGTCCCAAGAAATATAGTTGATCATGATACTCAAACGTGTC 600
PVYSN      CTGATGTGCATGATGCAGAAGTACCAGAATATAGTTGACCATGATACTCAAACATGTC 600
BiMVsp     CAGACGTTACGATGCAGAATTGCCACGAATTTAGTCGATCACAAACACAAACGTGTC 600
           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PVYLYE      ATGTCGTTGATCTTTTGGCTCGCAAACAACCTGGGTATCATATTCTAAAAGCATCTAGTG 660
PVYSN      ACGTGGTTGACTCTTTTGGTTCGCAAACAACCTGGATATCATATTCTAAAAGCATCTAGTG 660
BiMVsp     ACGTAGTCGATTCGTACGGCTCAATGACTACTGGTTTTACATTTTAAAAGCAGCCACAG 660
           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PVYLYE      TGTCTCAACTTATCTTGTTCGCAATGATGAGTTAGAATCTGATATAAAACACTATAGAG 720
PVYSN      TGTCTCAACTTATCTTGTTCGCAATGATGAGTTAGAATCTGATATAAAACACTATAGAG 720
BiMVsp     TTTCTCAACTCATTTCTTGTCTAACGACGAATTAGAATCAGACATCAAGCATTACAGGG 720
           * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PVYLYE      TTGGT 725
PVYSN      TTGGT 725
BiMVsp     TTGGA 725
           ****

```


Apêndice 7. Alinhamento múltiplo utilizando o programa CLUSTAL W para a sequência de nucleotídeos da VPg entre os isolados BiMV-SP e outros isolados de PVY.

```

PVYSN      GGAAAAATAAATCCAAGAGAATTCAAGCCTTGAAGTTTCGCCATGCTCGCGACAAGAGGG 60
PVYLYE     GGAAAAATAAATCCAAAAGAATTCAAGCTCTAAAGTTTCGACATGCTCGCGACAAGAGGG 60
BiMVSP     GGAAAACAAAAGGCCAAAAGAATTCAAGCACTCAAGTTCAGAAGGGCCAGAGATAAGCGAG 60
          *****  * * * * *  *****  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * *
PVYSN      CTGGCTTCGAAATCGACAATAATGATGACACAATAGAGGAATTCCTTGGATCTGCATACA 120
PVYLYE     CTGGCTTTGAAATTGATAACAATGATGATACAATTGAAGAATTCCTTGGATCTGCATACA 120
BiMVSP     CGGGTTTTGAGCTCGATAATAACGATGACACAATTGAAGAATTCCTTGGATCCCGGTACA 120
          * * * * *  * * * * *  *****  *****  * * * * *  *****  * * * * *
PVYSN      GGAAGAAAGGAAAAGGTTAAAGGCCACCACAGTTGGTATGGGCAAGTCGAGTAGGAGATTCA 180
PVYLYE     GAAAGAAAGGAAAAGGCCAAAGGCCACCACAGTTGGCATGGGCAAGTCAAGCAGGAGGTTTCG 180
BiMVSP     GAGAGAAGGGCAAGAAGAAGGGACAACAGTTGGCATGGGAAAATCAAATAGACGATTTA 180
          * * * * *  * * * * *  *****  *****  * * * * *  * * * * *  * *
PVYSN      TCAACATGTATGGATTTGATCCAACAGAGTACTCATTCATCCAATTCGTTGATCCACTCA 240
PVYLYE     TCAACATGTATGGATTTGATCCAACAGAGTACTCATTCATCCAATTCGTCGATCCACTCA 240
BiMVSP     TCAACATGTATGGTTTCGAACCGAGGGAGTTTTCATACATTGATTTGGGACCCCTTGA 240
          *****  *****  * * * * *  *****  *****  *****  *****  * * * * *
PVYSN      CTGGAGCACAAAATAGAAGAGAATGTCTATGCTGACATTAGGGATATTCAAGAAAAGATTTA 300
PVYLYE     CTGGAGCACAAAATAGAAGAGAATGTCTATGCTGATATTAGAGATATTCAAGAAAAGATTTA 300
BiMVSP     CTGGTGTCAAATGGAAGAAAATGTTTATGCTGATATCTTGGATGTTTCAGGAACGTTTTG 300
          *****  *****  *****  *****  * * * * *  *****  * * * * *
PVYSN      GTGAAGTGCGAAGGAAGATGGTTGAGGATGACGAAAATAGAAAACGCAAGCCTTGATAGTC 360
PVYLYE     GTGAAGTGCGGAAGAAGATGGTCGAGGACGACGAAAATAGAAAATGCAAGCCTTGCGTAGCA 360
BiMVSP     GTGATATCAGACGCAAGCTGATAGAGGAAGATGAGTTAGATCCACAATTGACATATACAA 360
          *****  * * * * *  *****  *****  * * * * *  *****  * * * * *
PVYSN      ACACGAGCATAACATGCTTACTTCAGGAAAGATTGGTCTGACAAAGCTTTGAAGATCGACT 420
PVYLYE     ACACGAACATAACATGCTTACTTTAGGAAAGATTGGTCTGACAAAGCTTTAAAGGTCGACT 420
BiMVSP     ATACAGCGATTTCATGCGTATTTAAGGAAAGACTGGTCGAATAAAGCCCTCAAAGTCGATT 420
          * * * * *  * * * * *  *****  *****  * * * * *  *****  * * * * *
PVYSN      TAATGCCACATAACCCACTTAAGGTTTGTGACAAAACAAAATGGCATTGCTAAATTCCTTG 480
PVYLYE     TAATGCCACATAACCCACTTAAGATTTGTGACAAGACAAAATGGCATTGCCAAATTTCCCTG 480
BiMVSP     TACTGCCACACAATCCGTTGAAAATATGCGACAAGACAAAATGGAATCGCAAAGTTTCCAG 480
          ** *****  * * * * *  * * * * *  *****  *****  * * * * *  * * * * *
PVYSN      AGAGAGAGTTTGAAGTGAAGGAGACTGGACCAGCTGTGGAAGTTAATGTGAAGGACATAC 540
PVYLYE     AGAGGGAGTTCGAATTAAGACAAAAGTGGACCAGCTGTAGAAGTCGATGTGAAGGACATAC 540
BiMVSP     AACGAAAAGGCGAGCTTCGCCAAACTGGCGGCGAGTTGAGGTGGATGTTGAGGATATTC 540
          * * * * *  * * * * *  *****  *****  * * * * *  *****  *****  * * *
PVYSN      CAAAACAGGAAGTGGAGCACGA 562
PVYLYE     CAAAACAGGAAGTAGAGCATGA 562
BiMVSP     CAAAAGTGAAGGTTGAACACGA 562
          *****  * * * * *  * * * * *

```


Apêndice 10. Alinhamento múltiplo utilizando o programa CLUSTAL W para a sequência de nucleotídeos da região 3'UTR entre os isolados BiMV-SP e outros isolados de PVY.

```

PVYSN      TGTGATGTCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTA-CATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTT 59
PVYLYE     TGTGATGTCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTA-CATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTT 59
BiMVSP     TGTGTTTTAACTG-GGATGAAATATAAGTATATATCGTATGCAATATATATTTTGGCTTT 59
          **** * * ** *** ** ***** ** * ***** ** *****
PVYSN      TCCTGTACTIONTTTTATTGTAACATAAATCAGTTTGAATATTATTAATAGATAGAGGTG 119
PVYLYE     TCCTGTACTIONTTTTATTGCAACTAATAATCAGTTTGAATATTATTAATAGATAGAGGTG 119
BiMVSP     TCCTGTACTIONTTAATTACGACTTTACAGTATTGTGATCTAAGGCAACGTA---AGGTG 116
          ***** ** ** * ** * * * * * * * * * * * * * * *
PVYSN      GCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTGTTATTTCTGCATTATTAAGTTTTAT 179
PVYLYE     GCAGGATGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTGTTATTTCTGCATTATTAAGTTAAT 179
BiMVSP     GCTTGTAGATTCTGTCTTCAAGGTGACTTGCCTTCCGTTTCCGTTTCTATCTGTTCTAGTTT-AT 175
          ** * **** ** * ***** * ***** * * **** **
PVYSN      ATAAAAGTGCCGGGTGTTGTTGTTGTAGGTGAACCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTT 239
PVYLYE     ATAAAAGTGCCGGGTGTCGTTGTTGTAGATGAACCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTT 239
BiMVSP     GTTAAAGTTCCGGGTGGCTTGCCTT-----GTGATGTTGCGATTT 216
          * ***** ***** * **** *****
PVYSN      TGTCGTAACAGTGACTATGTCTGGCTCTATCTACTTGGGTGGTGTGATTCCGTCATA 299
PVYLYE     TGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTACTTGGGTGGTGTGATTCCGTCATA 299
BiMVSP     CGTCGTAGCAGTGAC---ATTAAGCTTGACATCAGGAGAC----- 252
          ***** ***** * * * * * *
PVYSN      GCAGTGACTGTAAACTTCAATCAGGAGAC 328
PVYLYE     ACAGTGACTGTAAACTTCAATCAGGAGAC 328
BiMVSP     -----

```