

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

Athos Silva de Oliveira

Bean necrotic mosaic virus: um novo e distinto
tospovírus brasileiro

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende

Co-orientadora: Dra Alice Kazuko Inoue Nagata

Brasília, 2011

Athos Silva de Oliveira

Bean necrotic mosaic virus: um novo e distinto
tospovírus brasileiro

Dissertação aprovada por:

Dr. Renato de Oliveira Resende (Orientador) – Departamento de Biologia Celular, UnB;

Dr. Tatsuya Nagata – Departamento de Biologia Celular, UnB;

Dra. Marília Santos Silva – Embrapa Cerrados (CPAC).

RESUMO

Os tospovírus (família *Bunyaviridae*) são fitopatógenos que possuem genoma de RNA fita simples tripartido, denominados S (*Small*), M (*Medium*) e L (*Large*). Os dois primeiros possuem polaridade ambisenso e o último polaridade negativa. São vírus envelopados e transmitidos por tripes, insetos da ordem Thysanoptera, de maneira circulativa e propagativa. Além disso, acarretam significantes perdas na produção e qualidade de vegetais de interesse econômico em diversas partes do mundo. Neste trabalho um novo e distinto tospovírus foi isolado em plantas de feijão apresentando mosaico com áreas necróticas. Após experimentos de caráter biológico, sorológico e molecular, este foi caracterizado e nomeado tentativamente de *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV). No processo de caracterização biológica o BeNMV apresentou um estreito espectro de hospedeiros, replicando-se sistemicamente somente em três plantas indicadoras (*Datura stramonium* L., *Physalis pubescens* L. e *Phaseolus vulgaris* L. cv. Santana) após transmissão por inoculação mecânica. Diferentemente do esperado, os sintomas visualizados no campo não foram reproduzidos em *Phaseolus vulgaris* em casa de vegetação. BeNMV mostrou-se sorologicamente diferente quando comparado com outras espécies brasileiras em ensaio de diferenciação sorológica realizado após produção de anticorpo policlonal anti-BeNMV. Entretanto, uma fraca reação cruzada foi observada entre *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e este novo tospovírus. Na caracterização molecular duas proteínas estruturais foram elucidadas, o precursor das glicoproteínas do envelope Gn e Gc e a RNA polimerase dependente de RNA ou proteína L. Ambas apresentaram o maior tamanho entre as já caracterizadas, tendo 1141aa e 2932aa, respectivamente. Também, apresentaram uma baixa identidade com as demais, indicando, após estudos filogenéticos, a descoberta de uma provável nova ramificação evolutiva do gênero *Tospovirus*. Curiosamente, talvez por suas características intrínsecas e significativamente divergentes quando comparado as demais espécies do gênero, ainda não foi possível caracterizar a proteína estrutural do nucleocapsídeo (N) viral. Trabalhos estão em andamento para concluir a caracterização deste novo e distinto tospovírus.

ABSTRACT

Tospoviruses (family *Bunyaviridae*) are plant-infecting pathogens with a tripartite RNA genome, named S (Small), M (Medium) and L (Large). The latter has a negative polarity, while the other two have ambisense polarity. These viruses have enveloped particles and are transmitted by thrips insects (order *Thysanoptera*) in a circulative-propagative manner. Moreover, tospoviruses cause significant quality and yielding losses to economically important cultures worldwide. In this study a new and distinct tospovirus was isolated from bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) showing necrotic mosaic symptoms. After biological, serological and molecular assays, the new virus was characterized and tentatively named *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV). BeNMV showed a narrow host-range, presenting systemic infection, after mechanical inoculation, on three different indicator host-species (*Datura stramonium* L., *Physalis Pubescens* L. and *Phaseolus vulgaris* L., cv. Santana). Alternate from what could be expected, field-observed symptoms were not reproducible on greenhouse grown beans. As demonstrated in serological differentiation assays utilizing specific polyclonal antisera, BeNMV was distinct from other known tospoviruses common in Brazil. Weak cross-reaction was detected between *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) and the new tospovirus. Two viral structural proteins were resolved, being the largest ones known among the tospoviruses so far - the glycoprotein precursor of Gn and Gc envelope proteins and the RNA-dependent RNA polymerase (L protein) with 1141aa and 2932aa, respectively. Both proteins showed little identity with available sequences from other tospovirus species in phylogeny assays, indicating that BeNMV constitutes a new evolutionary branch in the genus *Tospovirus*. Due to BeNMV's discrete genome coding and significant divergence from other tospovirus species, the nucleocapsid structural protein (N) could not be characterized. Further efforts are being made to achieve complete characterization of this new and distinct tospovirus.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Tospovírus: Uma visão geral.....	6
1.2. Organização genômica e expressão gênica	7
1.3. Maturação da partícula	9
1.4. Movimento célula-a-célula.....	10
1.5. Transmissão.....	11
1.6. Diversidade e taxonomia	13
1.7. Aspectos econômicos e epidemiológicos	14
1.8. Resistência a tospovírus.....	15
1.9. Hipótese científica e objetivos da Dissertação	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1. Microscopia eletrônica	18
2.2. Espectro de hospedeiros e sintomatologia.....	18
2.3. Purificação do Vírus e Sorologia.....	19
2.4. Extração de RNA.....	20
2.5. RT-PCR, clonagem e sequenciamento	20
2.6. Análises <i>in silico</i>	21
3. RESULTADOS	23
3.1. Ultraestrutura, espectro de hospedeiros e sintomatologia	23
3.2. Purificação de nucleocapsídeo e análise sorológica	26
3.3. Sequências genômicas do <u>RNA S</u>	27
3.4. Sequências genômicas do <u>RNA M</u>	29
3.5. Sequências genômicas do <u>RNA L</u>	33
3.6. Análise filogenética	36
4. DISCUSSÃO	38
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
AGRADECIMENTOS	52
LISTA DE FIGURAS	54
LISTA DE TABELAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tospovírus: Uma visão geral

A doença conhecida como “spotted wilt” causada por tospovírus foi descrita pela primeira vez na Austrália em 1915 (Brittlebank, 1919). Não obstante, a demonstração que o agente etiológico desta doença era um vírus ocorreu em 1930, sendo este nomeado de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Samuel *et al.*, 1930). Em 1984, Milne *et al.* notaram a similaridade entre TSWV e os vírus da família *Bunyaviridae* que, até então, era composta, apenas, por vírus que infectam animais. Trabalhos posteriores validaram a criação e a posição do gênero *Tospovirus*, o único fitopatogênico, dentro desta família, sendo *Tomato spotted wilt virus* a espécie tipo do gênero (Fauquet *et al.*, 2005). Atualmente, a família *Bunyaviridae* é composta por cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*.

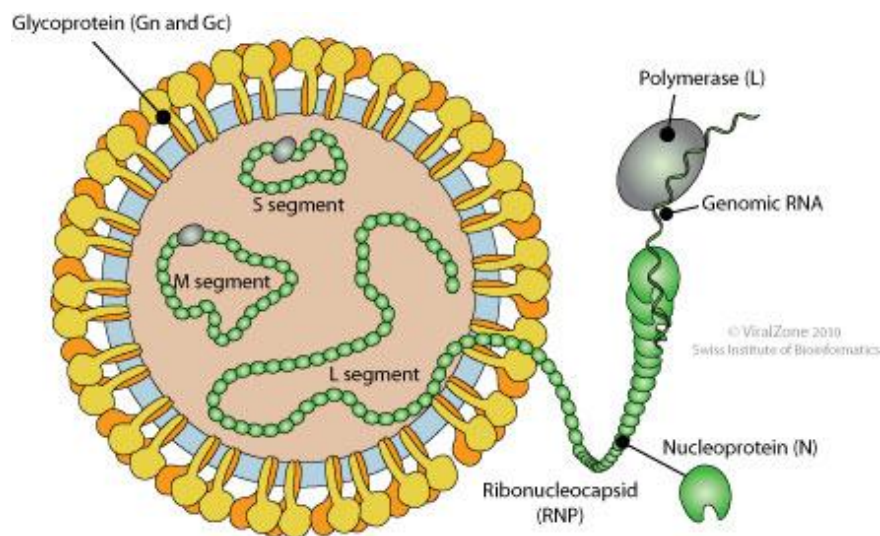


Figura 1.1. Ilustração esquemática da partícula de um tospovírus. Como indicado na figura são quatro proteínas estruturais virais: as glicoproteínas Gn e Gc (em amarelo e laranja) formando dímeros e inseridas no envelope da partícula; a proteína N (em verde) ancorada nos RNA virais e; a proteína L (em cinza), também associada aos RNA virais. Assim, as duas últimas juntas com os segmentos virais formam os complexos ribonucleoprotéicos, também conhecidos como ribonucleocapsídeos (RNP). Os RNA virais, de acordo com o tamanho, são classificados em segmentos S (*small*), M (*medium*) e L (*large*). Fonte da ilustração: expasy.com / ViralZone 2010 Swiss Institute of Bioinformatics.

Os tospovírus causam doenças que acarretam significantes perdas na produção e qualidade de vegetais de interesse econômico em diversas partes do mundo (Pappu *et*

al., 2009). São transmitidos por um número limitado de espécies de tripses (ordem *Thysanoptera*) de maneira circulativa e propagativa (Wijkamp *et al.*, 1993). Possuem partículas virais pleiomórficas de 80-120nm de diâmetro, genoma de RNA fita simples tripartido com polaridade negativa ou ambisenso e são envelopados. Assim, o vírion é composto por ribonucleoproteínas (RNP), que são os segmentos de RNA encapsidados por nucleoproteínas (N) e por algumas cópias da RNA polimerase viral dependente de RNA (proteína L) (van Poelwijk *et al.*, 1993). O envelope que circunda estes complexos ribonucleoprotéicos é oriundo de membranas celulares dos hospedeiros e possui projeções na sua superfície compostas pelas glicoproteínas virais Gn e Gc (Kikkert *et al.*, 1999). A figura 1.1 ilustra de forma esquemática a partícula de um tospovírus.

É importante mencionar que TSWV foi utilizado como objeto de estudo na maioria dos trabalhos de caracterização e elucidação do ciclo de vida dos tospovírus. Muitas das informações descritas nesta revisão estão sendo extrapoladas para todas as espécies do gênero.

1.2. Organização genômica e expressão gênica

Os segmentos genômicos são denominados RNA S (*Small*), RNA M (*Medium*) e RNA L (*Large*). Apresentam, utilizando-se TSWV como parâmetro, 2,9Kb, 4,8Kb e 8,9Kb de comprimento, respectivamente. Possuem sequências terminais com uma complementaridade parcial que permite o surgimento de uma conformação pseudocircular ou “*panhandle*” (De Haan *et al.*, 1989). O RNA S codifica uma proteína não estrutural supressora de silenciamento gênico no sentido viral denominada NSs e a nucleoproteína N no sentido complementar viral (De Haan *et al.*, 1990; Takeda *et al.*, 2002). O RNA M codifica uma proteína não estrutural de movimento no sentido viral denominada NSm e o precursor das glicoproteínas do envelope (Gn e Gc) no sentido complementar viral (Kormelink *et al.*, 1992; Storm *et al.*, 1998). Já o RNA L, diferentemente dos segmentos anteriores que apresentam sequências ambisenso, possui somente polaridade negativa e codifica uma grande proteína (proteína L) com motivos conservados e encontrados em RNA polimerases dependentes de RNA (De Haan *et al.*, 1991).

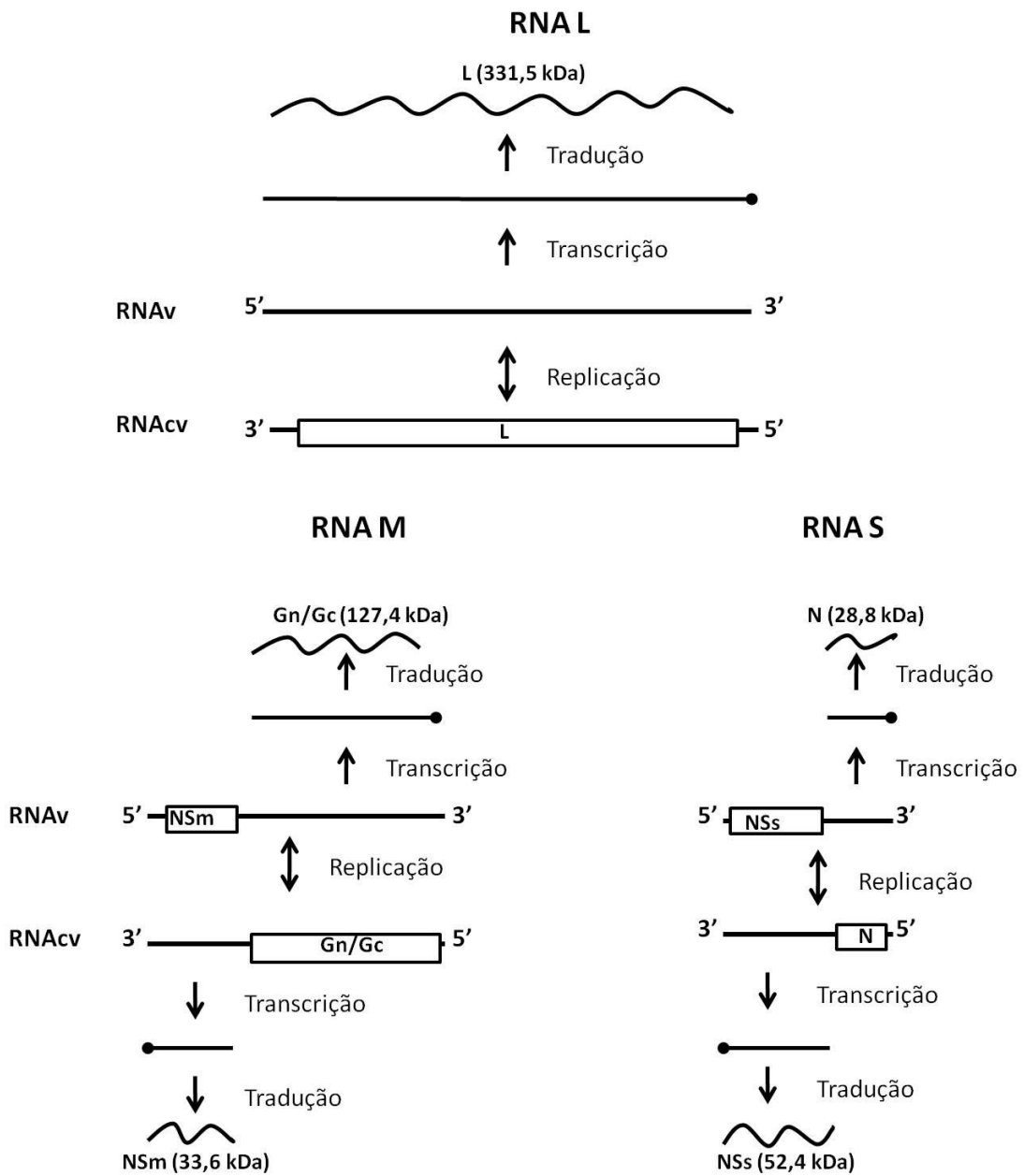


Figura 1.2. Organização genômica e estratégia de expressão de um tospovírus. Ilustração esquemática do RNA viral e complementar viral após replicação. Os blocos representam as sequências codantes ou ORFs (*open reading frame*) dentro do genoma. As retas com circunferências nas extremidades representam os RNAm encapsidados. Já as proteínas virais estão esquematizadas pelas linhas flexuosas. Os valores de massa molecular das proteínas virais de TSWV estão descritos entre parênteses como valores de referência.

Como em outros vírus de RNA senso negativo, a RNA polimerase dependente de RNA de tospovírus desempenha múltiplas funções durante o processo de propagação na célula hospedeira, apresentando atividade de replicase, transcriptase, nuclease, helicase e NTPase (Tordo *et al.*, 1992; Adkins *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 2003). Nos eventos de replicação e transcrição, os complexos ribonucleoprotéicos (RNP) são requeridos como molde, não havendo processo replicativo caso o RNA viral esteja “nu”. Com isso, a presença da proteína N é indispensável, estando também envolvida na regulação da replicação e transcrição do genoma viral (Adkins, 2001; Snippe *et al.*, 2007).

A expressão das proteínas virais exige a transcrição de RNA mensageiros subgenômicos tanto a partir do RNA viral quanto do complementar viral nos segmentos ambisenso (S e M) ou somente do viral no caso do segmento L (German *et al.*, 1992) (Figura 1.2). A transcrição desses RNAm é iniciada por um processo chamado *cap snatching*: RNA mensageiros do hospedeiro são recrutados pelo complexo da polimerase viral e subsequentemente clivados, geralmente entre 12 a 18 nucleotídeos após a capa metil 5'. As sequências resultantes (*capped leader sequences*) são utilizadas como iniciadores (*primers*) na extensão dos transcritos (Duijsings *et al.*, 1999, 2001). Em um estudo com TSWV foi mostrada uma preferência da proteína L *in vitro* por RNA mensageiros capa metil 5' doadores com múltipla complementaridade de bases ao RNA viral (van Knippenberg *et al.*, 2005).

Após extensão catalisada pela proteína L, os RNAm virais contêm capa metil 5' e, diferentemente dos RNAm do hospedeiro, não apresentam cauda poli(A). Depois de processados, os RNAm virais se associam com o aparato de tradução da célula hospedeira e, por conseguinte, as proteínas virais são produzidas (Whitfield *et al.*, 2005). Além de participar diretamente do processo de expressão gênica nos segmentos S e M, o RNA complementar viral é utilizado como molde para síntese de novos RNA virais que serão encapsidados. Este mecanismo de replicação vale para os três segmentos (German *et al.*, 1992).

1.3. Maturação da partícula

No processo de infecção de células vegetais por TSWV, as partículas maduras são formadas através do “envolvimento” das RNP por cisternas inteiras do complexo de Golgi gerando partículas duplamente envelopadas. Estas, por sua vez, fusionam-se umas

com as outras e depois com membranas derivadas do retículo endoplasmático formando grupos de partículas maduras (com um único envelope) concentradas dentro de grandes vesículas no citoplasma. Lá ficam retidas até serem retiradas pelo inseto vetor durante a sua alimentação (Pettersson & Melin, 1996). As modificações das membranas, tanto do complexo de Golgi quanto do retículo endoplasmático durante o processo de infecção na célula vegetal são induzidas pelas glicoproteínas Gn e Gc como demonstrado por Ribeiro *et al.* (2008) através da expressão transiente e ensaios de imunomarcação dessas duas proteínas em protoplastos.

O processo de montagem da partícula de um tospovírus em uma célula vegetal difere do realizado pelos bunyavírus que infectam animais. Nos últimos, as partículas maduras são geradas pelo brotamento das RNP do lúmen das cisternas do Golgi contendo as glicoproteínas virais. As partículas envelopadas formadas são secretadas pela célula hospedeira (Elliott, 1990). Esse processo de montagem é também sugerido para TSWV, mas durante a sua replicação no inseto vetor (Nagata *et al.*, 1999).

1.4. Movimento célula-a-célula

A movimentação viral dentro de hospedeiros vegetais é bastante diferente do observado em animais, já que os primeiros apresentam parede celular composta por polissacarídeos estruturais. Com esta barreira física fica inviabilizada a movimentação por exocitose ou através da lise celular. Assim, os vírus de plantas necessitam de um arcabouço molecular especial que permita o trânsito de partículas para colonização e utilização da maquinaria celular vegetal. Não obstante, já que os tospovírus replicam tanto em células vegetais quanto em animais, há duas estratégias diferentes de movimentação.

Em plantas, a movimentação dos tospovírus é mediada pela proteína NSm. Há vários trabalhos que validam a participação direta desta proteína no movimento célula-a-célula em hospedeiros vegetais. Kormelink e colaboradores (1994), por exemplo, inicialmente demonstraram o aparecimento precoce e transiente de NSm em tecido vegetal infectado com TSWV e sua associação à agregados de RNP, além da observação de modificações nos plasmodesmas. Posteriormente, a expressão de NSm em protoplastos e células de inseto induziu a formação de estruturas tubulares na periferia de ambos os tipos celulares, sendo que *in planta* as tais estruturas localizavam-

se especificamente nos plasmodesmas (Storms *et al.*, 1995). Outro trabalho foi a identificação de domínios na proteína NSm de TSWV envolvidos na formação de estruturas tubulares, movimento e sintomatologia em *Nicotiana benthamiana* e protoplastos a partir de deleções e mutações induzidas na sequência gênica de NSm (Li *et al.*, 2009). Como o diâmetro da partícula dos tospovírus excede o diâmetro dos plasmodesmas, não é esperado o transporte da partícula madura e, sim, o transporte das RNP através das estruturas tubulares que atravessam os plasmodesmas (Storms *et al.*, 1995).

Apesar de ter sido detectada em diferentes estádios de vida de tripes (Storms *et al.*, 2002) e da formação de estruturas tubulares induzidas pela sua expressão transiente em células de *Spodoptera frugiperda* (Storms *et al.*, 1995), não há indícios do envolvimento de NSm na movimentação viral dentro do inseto vetor. De qualquer forma, a movimentação célula-a-célula dentro do tripe parece ocorrer por exocitose. Proteínas de TSWV, por exemplo, foram associadas com estruturas delimitadas por membrana em células epiteliais do intestino médio aparentemente fusionadas com a membrana basal, além da observação de vírions brotando da porção basal de células do intestino médio infectadas (Ullman *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 2002).

1.5. Transmissão

Os tospovírus são transmitidos por um número limitado de espécies de tripes (ordem *Thysanoptera*) de maneira circulativa e propagativa (Ullman *et al.*, 1993; Wijkamp *et al.*, 1993; Mound, 1996). Apesar da existência de mais de 5000 espécies desses insetos, somente 10 são conhecidas como potenciais vetores de tospovírus (Tabela 1.1), sugerindo uma co-evolução entre vírus e vetor referente à especificidade de transmissão (Pappu *et al.*, 2009).

Tabela 1.1. Tospovírus com vetores conhecidos

Vírus	Tripes
Capsicum chlorosis virus	<i>Ceratothripoides claratris</i> , <i>Thrips palmi</i>
Calla lily chlorotic spot virus	<i>T. palmi</i>
Chrysanthemum stem necrosis virus	<i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>F. schultzei</i> , <i>F.</i>

	<i>gemina</i>
<i>Groundnut ringspot virus</i>	<i>F. occidentalis, F. schultzei, F. intonosa</i>
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	<i>F. occidentalis, F. schultzei, F. intonosa</i>
<i>Iris yellow spot virus</i>	<i>T. tabaci</i>
Melon yellow spot virus	<i>T. palmi</i>
<i>Groundnut bud necrosis virus</i>	<i>T. palmi, F. schultzei, Scirtothrips dorsalis</i>
Peanut chlorotic fanspot virus	<i>S. dorsalis</i>
<i>Peanut yellow spot virus</i>	<i>S. dorsalis</i>
<i>Tomato chlorotic spot virus</i>	<i>F. occidentalis, F. schultzei, F. intonosa</i>
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>F. cephalica, F. occidentalis, F. schultzei, F. intonosa, F. bispinosa, F. fusca, T. setosus, T. tabaci</i>
Tomato yellow fruit ring virus	<i>T. tabaci</i>
<i>Watermelon bud necrosis virus</i>	<i>T. palmi</i>
Watermelon silver mottle virus	<i>T. palmi</i>
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i>	<i>F. zucchini</i>

Groundnut e peanut têm sido utilizados na literatura alternadamente.

Tabela adaptada de Pappu *et al.*, 2009

Os tripses apresentam ciclo de vida composto pelas seguintes fases: ovo, dois estádios larvais (primeiro e segundo ínstar), pré-pupa, pupa e inseto adulto. Assim, fêmeas adultas colocam ovos sobre as plantas e, após a eclosão, seguem os dois estádios larvais que se alimentam das folhas e partes florais. Nos estádios de pupa subsequentes não há alimentação, além de ocorrer no solo ou na planta dependendo da espécie de tripses. Os adultos alados gerados emergem e tendem a se dispersar amplamente (Whitfield *et al.*, 2005). Tripses adultos que se alimentam em plantas infectadas com tospovírus não se tornam virulíferos, mesmo quando submetidos à alimentação experimental prolongada. A aquisição viral somente ocorre nos estádios larvais e a transmissão só é observada no final do estágio de segundo ínstar, mas é realizada com maior eficiência pelos adultos virulíferos (van de Wetering *et al.*, 1996; Moritz *et al.*, 2004).

Após ingestão das partículas virais, os vírions chegam ao intestino médio, primeiro sítio de ligação e entrada nas células do inseto. Lá, replicam-se e, por um mecanismo não conhecido, atravessam a membrana basal chegando às células musculares viscerais, onde continuam a se propagar (Nagata *et al.*, 1999). Posteriormente, atravessam a

membrana basal dessas células e adentram a glândula salivar. Os vírions saem da glândula salivar através da membrana apical e são expelidos com as secreções salivares nos tecidos vegetais durante a alimentação do tripes vetor (Whitfield *et al.*, 2005).

1.6. Diversidade e taxonomia

Os tospovírus estão amplamente distribuídos em todo o mundo. Algumas espécies como TSWV, *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV) são encontradas nos cinco continentes (Pappu *et al.*, 2009). Até a última publicação do ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) dezenove espécies já foram descobertas, sendo que onze são consideradas tentativas (Fauquet *et al.*, 2005). No Brasil, existem seis espécies até o momento: TSWV, IYSV, *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV), sendo que a última é a única ainda não relatada em outro país (Pozzer *et al.*, 1999; de Ávila *et al.*, 1993; Resende *et al.*, 1996). Inicialmente, TCSV e GRSV foram consideradas estirpes de TSWV, mas trabalhos sorológicos e moleculares estabeleceram diferenças e delimitaram a classificação taxonômica de espécie a partir da sequência de aminoácidos da nucleoproteína (N) (de Ávila *et al.*, 1993; de Ávila *et al.*, 1993b; Fauquet *et al.*, 2005). O número de espécies de tospovírus ocorrentes somente no Brasil torna a América do Sul a segunda porção continental com maior diversidade, ficando atrás do continente Asiático (Pappu *et al.*, 2009).

Para determinação de novas espécies a caracterização biológica e molecular se faz necessária para comparação da nova espécie proposta com as demais já caracterizadas. Com isso, espectro de hospedeiros, sintomatologia, ensaio de transmissão com tripes, testes sorológicos e análise genética da proteína N são comumente utilizados para caracterização, diferenciação e classificação taxonômica (Cortez *et al.*, 2001; Fauquet *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2008; Hassani-Mehraba *et al.*, 2010). São consideradas novas espécies de tospovírus aquelas que apresentam identidade de sequência de aminoácidos da proteína N menor que 90% em relação às demais (Fauquet *et al.*, 2005). Contudo, diversos trabalhos mostram que as sequências de aminoácidos da proteína NSm, das glicoproteínas Gn e Gc e da proteína L apresentam comportamento filogenético

semelhante a proteína N, sugerindo que todas elas podem refletir a evolução natural das espécies de tospovírus (Silva *et al.*, 2001; Lovato *et al.*, 2004; Bertran *et al.*, 2011).

1.7. Aspectos econômicos e epidemiológicos

As infecções causadas por tospovírus geram prejuízos significativos, principalmente em se tratando de hortaliças e plantas ornamentais. Dependendo da espécie de tospovírus o espectro de hospedeiros inclui um grande número de plantas de interesse econômico, além de plantas daninhas. TSWV, por exemplo, é conhecido por infectar mais de 900 espécies pertencentes a mais de 90 famílias botânicas diferentes, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas (Pappu *et al.*, 2009). As perdas são geradas não somente pela redução da produtividade, mas também pela deformação dos frutos refletindo diretamente na sua qualidade. A presença de TSWV em pimentão e tomate, por exemplo, diminui o crescimento e a produção das plantas quando infectadas ainda jovens. Os frutos dessas plantas desenvolvem defeitos visíveis em sua superfície e são desconsiderados para venda ou são retirados e vendidos verdes antes do aparecimento dos sintomas (Latham *et al.*, 1997). Já as plantas de batata apresentam tubérculos com anéis necróticos em sua superfície, além de necroses internas severas (Wilson, 2001). Perdas anuais na produção de amendoim causadas por TSWV já foram estimadas em mais de 100 milhões de dólares somente na Geórgia (Estados Unidos) e, na Ásia, prejuízos causados pelo tospovírus GBNV (*Groundnut bud necrosis virus*) em diferentes hortaliças foram estimados em mais de 89 milhões de dólares por ano (Pappu *et al.*, 2009).

As perdas geradas por tospovírus no Brasil são substanciais, principalmente em se tratando de hortaliças. GRSV e TSWV, por exemplo, são os mais economicamente importantes, causando prejuízos na produção de vegetais como tomate e pimentão (De Ávila *et al.*, 2004). Não obstante, há relatos de tospovírus de outras espécies, como TCSV e CSNV, infectando essas hortaliças no campo. ZLCV já é considerado um problema na produção de cucurbitáceas, assim como TCSV na produção de alface (*Lactuca sativa* L.) e, até mesmo, na de jiló (*Solanum gilo* Raddi) (Giampan *et al.*, 2009; Colariccio, *et al.*, 2004; Eiras *et al.*, 2002). Esses prejuízos notórios impulsionam a busca por variedades comerciais resistentes, principalmente de tomateiros.

O estudo epidemiológico das infecções causadas por tospovírus é de suma importância para o entendimento e controle dessas doenças. Pois, quando hospedeiros suscetíveis são cultivados em uma dada área e a fonte de vírus está presente, a presença e prevalência de tripes vetores, magnitude e disposição de inóculos virais e tipos de fontes de inóculos contribuem para o surgimento de grandes surtos. Assim, parâmetros climáticos, diferentes isolados virais, dinâmica de população de tripes, ervas daninhas hospedeiras e disposição dos hospedeiros em relação a fonte viral vêm sendo investigados (Pappu *et al.*, 2009).

1.8. Resistência a tospovírus

Existem inúmeros motivos que dificultam o controle das doenças causadas por tospovírus. Entre estes, encontram-se: (01) A dispersão cosmopolita dos tripes vetores (Reitz, 2009); (02) O amplo espectro de hospedeiros de algumas espécies como TSWV (Pappu *et al.*, 2009); (03) A dificuldade de combater os vetores a partir de métodos químicos ou biológicos (Robb *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995; Morse & Hoddle, 2006) e (04) A baixa disponibilidade de genes de resistência para propósitos comerciais. Até o momento, apenas dois genes dominantes de resistência a TSWV oriundos de vegetais foram bem descritos e validados na literatura.

O primeiro, denominado *Sw-5*, foi identificado em *Solanum peruvianum* e, após apresentar resistência ampla a vários isolados de TSWV, passou a ser introduzido por melhoramento genético em diferentes variedades de tomate (Stevens *et al.*, 1992, Boiteux & Giordano, 1993). O locus onde se encontra o gene *Sw-5* apresenta um agrupamento de genes, sendo que dois, nomeados de *Sw-5a* e *Sw-5b*, possuem domínios estruturais que os tornaram candidatos a genes de resistência (Brommonschenkel *et al.*, 2000; Spassova *et al.*, 2001). Entretanto, quando plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com ambos os genes, foi revelado que somente o gene *Sw-5b*, e não *Sw-5a*, é necessário e suficiente para conferir resistência contra TSWV. No entanto, a presença simultânea do alelo *Sw-5a* parece aumentar o grau de resistência (Spassova *et al.*, 2001). Além de mostrar resistência contra TSWV, plantas de tomate contendo esse gene mostraram-se resistentes a outras espécies filogeneticamente próximas, como TCSV e GRSV (Boiteux & Giordano, 1993). Não obstante, já foram relatados isolados de TSWV que conseguem quebrar a resistência conferida pelo gene *Sw-5* (Cho *et al.*,

1996; Aramburu & Marti, 2002). Além disso, já foram identificados pontos de mutação na proteína NSm de TSWV responsáveis por tais quebras de resistência (López, *et al.*, 2011).

O segundo gene, denominado *Tsw*, foi primeiramente identificado em acessos de *Capsicum chinense* que mostravam reação de hipersensibilidade a diversos isolados de TSWV (Black *et al.*, 1991). Diferentemente de *Sw-5*, o gene *Tsw* não confere resistência a espécies filogeneticamente próximas a TSWV, mas, assim como para *Sw-5*, isolados que conseguem quebrar a resistência já foram relatados na literatura (Roggero *et al.*, 2002).

Com a baixa disponibilidade de fontes naturais de resistência, outras estratégias também já foram e estão sendo realizadas para obtenção de plantas resistentes com o auxílio da engenharia genética. Vários exemplos podem ser listados, como a expressão da proteína N viral por plantas de tabaco e tomate geneticamente modificadas que, como resultado, apresentaram resistência a TSWV (Pang *et al.*, 1992; Ultzen *et al.*, 1995) ou, ainda, a expressão de versões do gene da proteína N não traduzíveis (mas possíveis de transcrição) que também levaram à resistência a TSWV (de Haan *et al.*, 1992). Isso mostrou uma atuação da molécula de RNA no processo de resistência, que, atualmente, é compreendido pelo mecanismo de PTGS (*post-transcriptional gene silencing*) ou RNA de interferência (RNAi) (Tijsterman *et al.*, 2002). Resistência a tospovírus mediada por RNA a partir da ativação de PTGS também foi observada na expressão de transcritos da proteína NSm em plantas de tabaco (Prins *et al.*, 1997) e de transcritos quiméricos da proteína N de diferentes tospovírus em *Nicotiana benthamiana* (Bucher *et al.*, 2006).

Outro ponto importante na busca de resistência ampla e estável a tospovírus é a grande diversidade de espécies e isolados do vírus, fato que constitui um obstáculo aos programas de melhoramento genético visando resistência a este gênero de vírus. O estudo da diversidade viral e a caracterização de novas espécies do gênero é, portanto, uma estratégia importante no controle de tospovírus.

1.9. Hipótese científica e objetivo da Dissertação

Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) apresentando sintoma sistêmico de mosaico com áreas necróticas (Figura 1.3) foram encontradas e coletadas em um campo

experimental de aproximadamente 200m² dentro do campus universitário da ESALQ (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”) - USP (Universidade de São Paulo). O primeiro registro da presença de partículas tipo tospovírus em plantas sintomáticas nesse campo ocorreu em 2006, visualizadas a partir de micrografias eletrônicas. Já a última inspeção visual foi realizada em abril de 2009, apresentando entre 1 a 5% de incidência de plantas sintomáticas (Comunicação pessoal, Dr. Elliot Watanabe Kitajima, ESALQ).

Baseando-se nessas observações preliminares da infecção em plantas de feijão, a hipótese científica do trabalho é que o isolado de feijão represente uma nova espécie do gênero tospovírus ainda não descrita. Visando comprovar esta hipótese, esta dissertação de mestrado teve como objetivo caracterizar a primeira nova espécie de tospovírus infectando naturalmente feijão no campo. Assim, experimentos de caráter biológico (espectro de hospedeiros e sintomatologia), sorológico, molecular e filogenético foram realizados para validar e classificar o agente etiológico do mosaico necrótico do feijão como uma nova espécie viral do gênero *Tospovirus*. A partir desses resultados é sugerido o nome tentativo de *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV) para este novo tospovírus.



Figura 1.3. *Phaseolus vulgaris* L. apresentando sintoma de mosaico necrótico. Sintoma sistêmico observado em plantas de feijão infectadas com o novo tospovírus caracterizado nesta dissertação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microscopia eletrônica

Plantas de feijão apresentando sintoma de mosaico com áreas necróticas foram coletadas em um campo experimental da ESALQ (USP). Amostras foliares foram processadas através da técnica de contrastação negativa com acetato de uranila 2%. Para a obtenção de secções ultrafinas, fragmentos foliares de feijão infectados foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, contrastados com acetato de uranila 2%, desidratados em série cetônica e incluídos em resina “Spurr”. A seguir, as secções foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL.

2.2. Espectro de hospedeiros e sintomatologia

O vírus encontrado em feijão foi transmitido, multiplicado e mantido em *Physalis pubescens* L. por inoculação mecânica. Foram utilizadas como fonte de inóculo folhas de feijão sintomáticas trituradas em tampão de inoculação (fosfato de sódio monobásico 0,01M e sulfito de sódio 0,01M, pH 7.0), além da adição de carbureto de silício (400 mesh) como abrasivo (De Ávila et al. 1993b).

Diversas plantas indicadoras das espécies *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn, *C. quinoa* Willd, *C. murale* L. pertencentes à família Chenopodiaceae, *Gomphrena globosa* L. (Amaranthaceae) e *Datura stramonium* L., *Solanum lycopersicum* L., *Nicotiana benthamiana* Domin., *N. rustica* L., *N. tabacum* L. (‘Samsun’), *Physalis pubescens* L., *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., pertencentes à família Solanaceae, entre outras, foram inoculadas mecanicamente utilizando-se *Physalis pubescens* L. sintomáticas como fonte de inóculo. Variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão caupi (*Vigna unguiculata* L., Walp.) e *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi, espécies da família Fabaceae, também foram inoculadas mecanicamente. Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação e o surgimento de sintomas foi observado até quatro semanas pós-inoculação.

2.3. Purificação do Vírus e Sorologia

Plantas de *P. pubescens* foram utilizadas como hospedeiras para replicação viral. Três semanas pós-inoculação mecânica, os nucleocapsídeos foram purificados a partir de 100g de massa foliar seguindo o protocolo descrito por De Ávila e colaboradores (1993b). O resultado da purificação foi visualizado através de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Os nucleocapsídeos purificados foram injetados em coelho para produção de anticorpos policlonais. As injeções foram subcutâneas, sendo três aplicações em intervalos de três semanas após emulsificação dos nucleocapsídeos com adjuvante de Freund's incompleto (1:1). Após três semanas da última aplicação, foi realizada a primeira coleta de sangue (15 ml). Para separação do soro, o sangue foi incubado em estufa a 37°C por 2h, seguido por um período mínimo de 2h a 4°C. O tubo foi centrifugado a 12857g por 3 minutos a 4°C e a fração sorológica (translúcida), aproximadamente metade do volume inicial, foi coletada e o volume ajustado para 10 ml com água destilada. Seguiu-se com a adição de um volume de solução de sulfato de amônio saturada. A mistura ficou em repouso durante 1h a temperatura ambiente. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 12857g por 30 minutos a 4°C e o pellet foi ressuscitado com 1 ml de PBS 0,5X (PBS 10X: NaCl 1,40M; KH₂PO₄ 0,02M; Na₂HPO₄ 12H₂O 0,08M; KCL 0,02M; pH 7.4). Após diálise em membrana de celulose (Sigma-Aldrich, catálogo D-9277) *overnight* em 2 litros de PBS 0,5X sob agitação, o antissoro foi diluído para absorvância de 1.4 (A₂₈₀).

A comparação sorológica deste tospovírus com outras espécies foi realizada através do DOT-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). As plantas infectadas foram trituradas em duas diluições antes de serem aplicadas na membrana de nitrocelulose: 1/100 e 1/1000 (massa de folha (g) / volume de PBS 0,5X (ml)). Utilizou-se antissoro policlonal específico contra a proteína do nucleocapsídeo do isolado de feijão em caracterização e das seguintes espécies presentes no Brasil: TSWV, TCSV, GRSV e ZLCV. Assim, as membranas foram incubadas *overnight* nos antissoros listados, diluídos em PBS 0,5X (1:1000). Após lavagem com PBS 0,5X (3 vezes por 3 minutos), as membranas foram incubadas em anticorpo secundário (*goat anti-rabbit*) conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) por 3h, também diluído em PBS 0,5X (1:30000). Novamente, as membranas foram lavadas em PBS 0,5X (3 vezes por 3 minutos). Para revelação foram utilizados os substratos BCIP (5-bromo-4-chloro-3-

indolyl phosphate) e NBT (nitro blue tetrazolium) diluídos em tampão de revelação (100mM NaCl; 100mM Tris; 5mM MgCl₂ - 6H₂O, pH 9,5) para uma concentração final de 0.05mg/ml e 0.1mg/ml, respectivamente. As membranas foram reveladas concomitantemente por um período de aproximadamente 15 minutos. O teste de DOT-ELISA também foi utilizado para confirmar a presença do novo tospovírus nas variedades de *Phaseolus vulgaris* pós-inoculação mecânica.

2.4. Extração de RNA

Para a extração de RNA total foram utilizados Trizol e Plant RNA Reagent (Invitrogen). Para ambos os métodos foram utilizados 100mg de tecido foliar de *D. stramonium* e *P. pubescens* sintomáticas, assim como *D. stramonium* sadia (controle negativo) e infectada com TSWV (controle positivo). A extração de RNA de nucleocapsídeo viral purificado foi realizada com Trizol LS (Invitrogen), utilizando-se 250µl de nucleocapsídeo purificado. Todos os processos de extração seguiram as recomendações do fabricante.

2.5. RT-PCR, clonagem e sequenciamento

Para a RT-PCR foram seguidos vários protocolos visando amplificar o RNA S integralmente ou parcialmente. Para amplificação completa foi utilizado o protocolo descrito por Cortez e colaboradores (2001) empregando os oligonucleotídeo J13 e UHP. Para amplificações parciais, oligonucleotídeos de regiões conservadas e degenerados foram desenhados a partir do alinhamento das sequências de RNA S dos tospovírus americanos já caracterizados com o auxílio do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

Na transcrição reversa foi utilizada a enzima “M-MLV Reverse Transcriptase” (Promega). Para a PCR foi utilizado o termociclador “C1000 Thermal Cycler” (Bio-Rad) e a enzima “Platinum Taq DNA Polymerase recombinant” (Invitrogen). As condições de execução da PCR foram adequadas de acordo com as características físico-químicas dos oligonucleotídeos. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta. Os produtos amplificados via RT-PCR foram eluídos do gel de agarose através do kit

“GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare). Em seguida, foram ligados em pGEM-T easy vector (Promega) e utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* (TOP10). Todos esses procedimentos seguiram as recomendações dos respectivos fabricantes e indicações contidas em Sambrook *et al.* (1989).

Outra estratégia para obtenção das sequências genômicas do novo tospovírus foi a construção de uma biblioteca de cDNA com o kit “Universal Riboclone cDNA Synthesis System” (Promega). Algumas modificações fizeram-se necessárias pela quantidade de RNA inicial utilizada, aproximadamente 500ng obtidos a partir de nucleocapsídeo purificado. Essas modificações referem-se a adequações proporcionais dos reagentes a quantidade inicial de RNA, já que o protocolo deste kit é otimizado para 2µg de RNA inicial.

Os plasmídeos recombinantes com as sequências de cDNA obtidas via RT-PCR ou via biblioteca de cDNA foram sequenciados pela técnica de reação de terminação em cadeia (Sanger *et al.*, 1977) utilizando-se sequenciador automático, realizado pela Macrogen Corporation, Seoul, Korea.

2.6. Análises *in silico*

A retirada da sequência de nucleotídeos do vetor e formação de *contigs* foi realizada com o programa Staden Package (Staden, 1996), assim como a busca das fases abertas de leitura e a determinação das sequências de aminoácidos. A análise da identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas com as sequências depositadas no GenBank foi realizada com a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponibilizada pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Os alinhamentos e as comparações de identidade das proteínas virais foram realizadas com o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). A busca por domínios nas sequências de aminoácidos das proteínas virais foi realizada pelos programas InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005) e SMART. Para predição do padrão de N-glicosilação, O-glicosilação e sítios de clivagem do precursor glicoprotéico foram utilizados os programas NetNGlyc 1.0 Server (Gupta *et al.*, 2004), NetOGlyc 3.1 Server (Julenius *et al.*, 2005) e SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004), respectivamente. Para predição das regiões transmembrânicas dessa mesma proteína foram utilizados os programas TMHMM

Server v. 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) e InterProScan. Já as árvores filogenéticas foram construídas com o programa Mega 5.01 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando-se o método estatístico Maximum Likelihood e bootstrap de 1000 replicatas.

3. RESULTADOS

3.1. Ultraestrutura, espectro de hospedeiros e sintomatologia

O primeiro indício da presença de um tospovírus nas amostras de feijão veio com a observação de partículas pleiomórficas de aproximadamente 80 a 120nm de diâmetro, agrupadas e envolvidas por membranas celulares, estruturas tipicamente encontradas em células infectadas por tospovírus (Figura 3.1).

Para avaliação da capacidade de transmissão por inoculação mecânica, espectro de hospedeiros e sintomatologia foram utilizadas diversas plantas. Apenas *Datura stramonium*, *Physalis pubescens* e *Phaseolus vulgaris* cv. Santana apresentaram sintomas sistêmicos evidentes pós-inoculação (Figura 3.2). A primeira apresentou mosqueado, lesões necróticas, nanismo e distorção foliar. A segunda, mosqueado e nanismo. Já a terceira, clorose internerval, distorção foliar e nanismo. Alguns hospedeiros apresentaram somente lesões locais, havendo prevalência de lesões necróticas como mostra a tabela 3.1.

Como o vírus foi encontrado em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) no campo causando mosaico necrótico e, das três variedades testadas via inoculação mecânica, apenas uma apresentou sintomas e bem distintos dos observados no campo, foi realizado teste sorológico (DOT-ELISA) para detecção e confirmação do novo tospovírus proposto. Como resultado, *Phaseolus vulgaris* cv. Santana, a única variedade sintomática, foi positiva para o teste, tanto em relação às folhas basais quanto apicais, confirmando presença sistêmica do vírus somente neste hospedeiro (Figura 3.3).

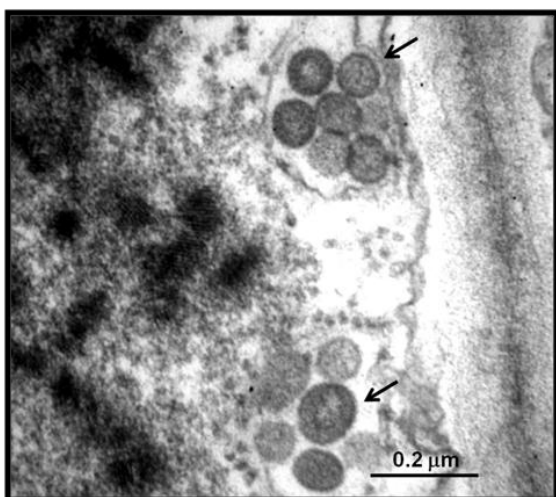


Figura 3.1. Micrografia eletrônica com partículas do novo tospovírus. As setas indicam as partículas virais características de tospovírus.

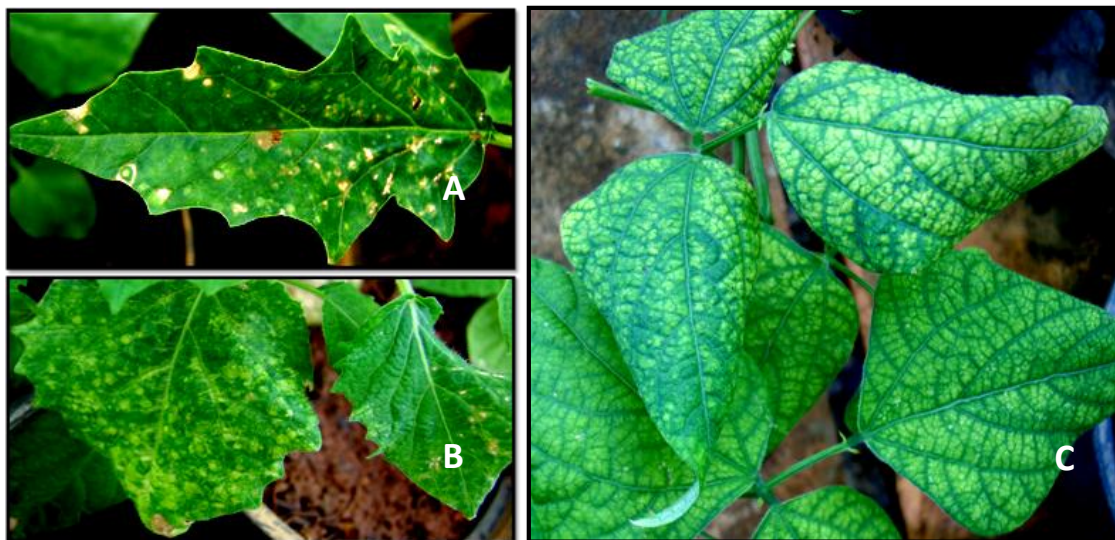


Figura 3.2. *D. stramonium* (A), *P. pubescens* (B) e *Phaseolus vulgaris* L cv. Santana (C) mostrando sintomas causados pelo novo tospovírus. Sintomas observados quatro semanas pós-inoculação mecânica.

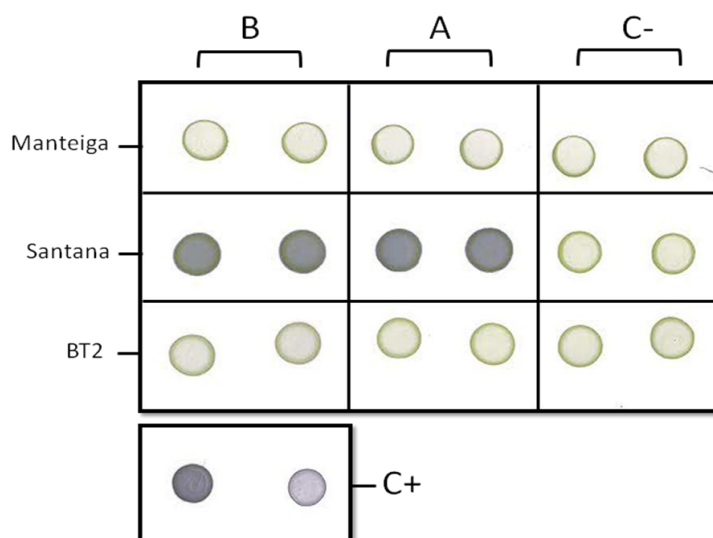


Figura 3.3. Confirmação sorológica da presença do novo tospovírus nas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. Santana, Manteiga e BT2. B: folhas da base; A: folhas do ápice; C-: controle negativo; C+: controle positivo (*Physalis pubescens* infectada com o novo tospovírus). Os dots foram feitos em duplicata com diluição 1:50 (massa de folha por volume de PBS 0,5X (g/ml)) com exceção do controle positivo que apresenta duas diluições, 1:100 e 1:1000.

Tabela 3.1. Espectro de hospedeiros do novo tospovírus determinado via inoculação mecânica em diversas plantas.

Hospedeiro	Sintomas Locais	Sintomas sistêmicos
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LN	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	LN	-
<i>Chenopodium murale</i>	LN	-
Cucurbitaceae		
<i>Cucurbita pepo</i>	PC	-
Fabaceae		
<i>Phaseolus vulgaris</i> “Manteiga”	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> “Santana”	-	Na, CI, DF
<i>Phaseolus vulgaris</i> “BT2”	-	-
<i>Vigna angularis</i>	-	-
<i>Vigna unguiculata</i>	-	-
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i>	-	-
<i>Capsicum chinense</i>	-	-
<i>Datura metel</i>	LN	-
<i>Datura stramonium</i>	-	LN, Mo, DF, Na
<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-
<i>Nicandra physaloides</i>	-	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	-
<i>Nicotiana rustica</i>	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i> Samsun	LN, CN	-
<i>Nicotiana tabacum</i> TNN	LN	-
<i>Physalis pubescens</i>	PC	Mo, Na

CN: clorose nas nervuras; CI: clorose internerval; DF: distorção foliar; LN: lesões necróticas; M: Mosaico; Mo: mosqueado; Na: nanismo; PC: pontos cloróticos.

3.2. Purificação de nucleocapsídeo e análise sorológica

Após purificação de nucleocapsídeo realizada de acordo com o protocolo de De Ávila e colaboradores (1993b), foi visualizada uma proteína de aproximadamente 29kDa em gel de poliacrilamida (Figura 3.4.). Assim, foi detectada uma proteína com massa molecular semelhante as demais nucleoproteínas de tospovírus do grupo americano, demonstrando mais uma evidência e tornando clara a presença de um tospovírus nas plantas de feijão com mosaico necrótico provenientes do campo.

A realização de DOT-ELISA para diferenciação sorológica ocorreu após obtenção de anticorpos policlonais contra a nucleoproteína do novo tospovírus. Como esperado foi confirmada a presença de uma espécie diferente em relação as demais espécies brasileiras utilizadas no ensaio (figura 3.5). Além disso, foi observada uma fraca reação cruzada entre o novo tospovírus com TSWV e GRSV, mas quase imperceptível. É importante mencionar que ensaios preliminares já apontavam o vírus tratado neste trabalho como uma provável nova espécie (Alice Nagata, comunicação pessoal). Um desses ensaios foi a realização de DAS-ELISA deste novo vírus contra os três principais tospovírus brasileiros: TSWV, TCSV e GRSV. Nesse teste também houve uma fraca reação cruzada com TSWV em algumas repetições (dados não mostrados), assim como observado no DOT-ELISA.

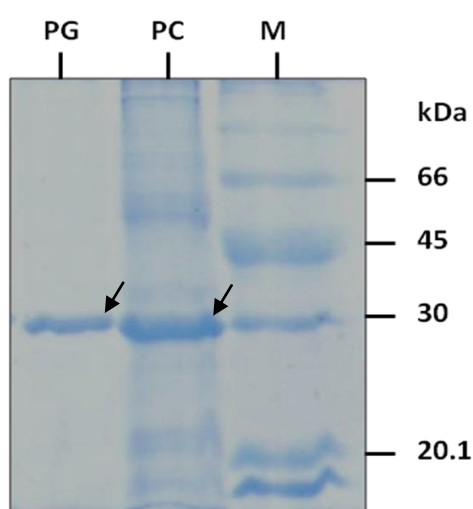


Figura 3.4. Análise da fração de nucleocapsídeo purificado do novo tospovírus via SDS-PAGE mostrando a presença da proteína viral com tamanho aproximado de 29 kDa. M: Protein Marker (HMV, Pharmacia), PC: nucleocapsídeo purificado não aplicado em gradiente de sacarose, PG: nucleocapsídeo purificado pós gradiente de sacarose. Gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue. As setas indicam a proteína de aproximadamente 29kDa.

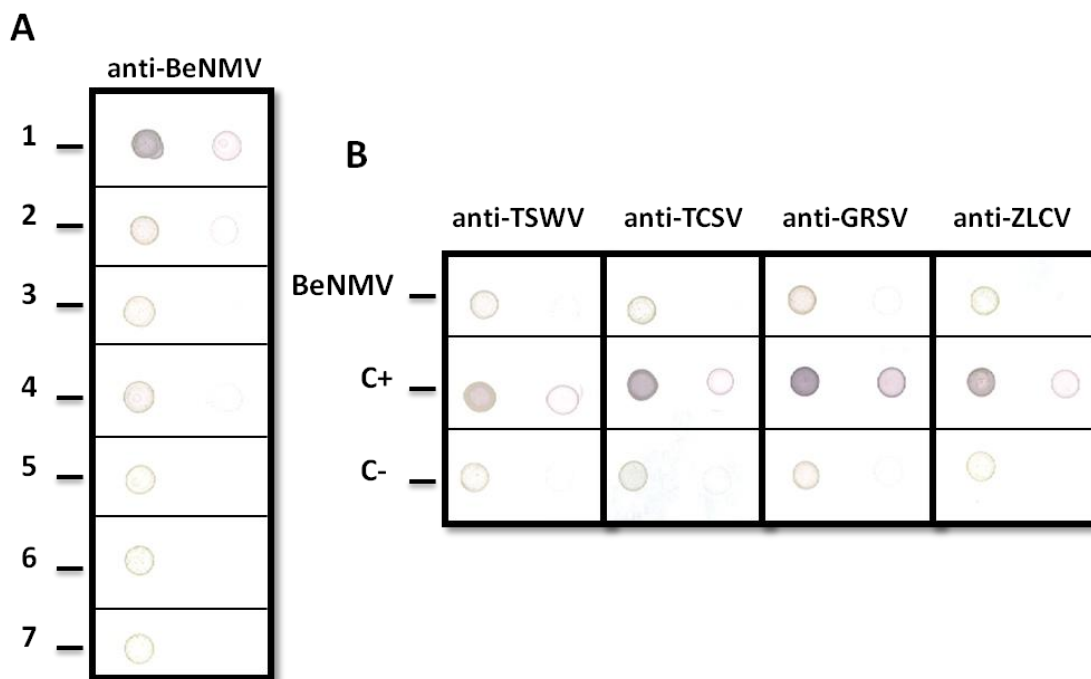


Figura 3.5. Diferenciação sorológica entre o novo tospovírus (BeNMV) e outras espécies presentes no Brasil. A - 1. *Physalis pubescens* infectada com o novo tospovírus, tentativamente já denominado de BeNMV (*Bean necrotic mosaic virus*); 2. *Datura stramonium* infectada com TSWV; 3. *D. stramonium* infectada com TCSV; 4. *D. stramonium* infectada com GRSV; 5. *D. stramonium* infectada com ZLCV; 6 e 7 controles negativos, *P. pubescens* e *D. stramonium* não infectadas, respectivamente. B - Confirmação da presença viral nas amostras utilizadas no ensaio de diferenciação sorológica. Os *dots* na primeira coluna são diluições 1:100 (massa de folha por volume de PBS 0,5X (g/ml)), já a segunda diluições 1:1000.

3.3. Sequências genômicas do RNA S

O objetivo primordial da análise molecular era a obtenção da sequência do segmento S RNA. Este codifica a proteína N, imprescindível para classificação taxonômica desta nova espécie dentro das exigências atuais do ICTV, e a proteína não estrutural NSs, que está potencialmente implicada na interação patógeno-hospedeiro. Com isso, a primeira estratégia utilizada para caracterização genômica do novo vírus foi a descrita por Cortez et al. (2001).

Esta estratégia consiste na amplificação completa do segmento S com a utilização do oligonucleotídeo J13 (possui 8 nucleotídeos conservados presentes nas terminações dos 3 segmentos virais) e da amplificação separada das sequências dos genes de N e NSs quando a PCR é realizada com J13 e UHP (oligonucleotídeo que se anela à região intergênica). Como resultado, não foi observado amplificação dos

fragmentos esperados na reação de RT-PCR com RNA do novo tospovírus. Já na reação com TSWV (controle positivo) houve amplificação esperada (dados não mostrados).

Um fato relevante é que todas as reações de RT-PCR do novo tospovírus foram realizadas com RNA extraído de nucleocapsídeos purificados pelo protocolo de De Ávila e colaboradores (1993b). Nas reações de RT-PCR com RNA total do novo tospovírus com o primer J13, nenhuma amplificação foi observada, mesmo que inespecíficas. Já com o vírus purificado houve ampliações de fragmentos de cDNA com massa molecular de até 1,2kb, que foram considerados de origem inespecífica.

Uma segunda estratégia foi a amplificação, mesmo que parcial, da proteína N a partir do desenho de oligonucleotídeos degenerados e de regiões conservadas entre as várias espécies de tospovírus do grupo americano. Sequências gênicas da proteína N de tospovírus já caracterizados foram coletadas no GenBank. Após alinhamento, três “ilhas” de nucleotídeos conservados foram encontradas e seis oligonucleotídeos foram sintetizados: TospoN240R (5'ATCACTTTGTTTTAYRACYTTCAT 3'), TospoN250F (5'ACAAAGTGATTTYAMYTTTGG3'), TospoN631F (5'GTCTCCCTCTCATTGCTTC3'), TospoN631R (5'AGAGGGAGACTACCTCC3'), TospoN870F (5'GGAACATTACAGTGA3') e TospoN870R (5'TAATGTTCCATAGCAA3'). Diversas reações de RT-PCR foram realizadas entre os oligonucleotídeos listados acima, além de combinações destes com J13, UHP e TospoAmFor (oligonucleotídeo cedido pelo prof. Tatsuya Nagata, que corresponde à extremidade do segmento S de tospovírus do grupo americano). Quase todas as reações de RT-PCR com RNA de TSWV (controle positivo) geraram fragmentos de massa molecular esperada (dados não mostrados). No entanto, nas reações realizadas com RNA do novo tospovírus somente uma combinação, TospoAmFor e TospoN870, gerou um fragmento de massa molecular próximo do esperado, além de outros fragmentos em baixa concentração. Assim, uma banda de 955pb (tamanho próximo do esperado) e outra de 1,6kb provenientes da reação realizada com os primers TospoAmFor e TospoN870 foram eluídas do gel de agarose, clonadas no vetor pGEM-T easy, sequenciadas e analisadas pelo programa BLAST. Diferente do esperado, já que os primers foram desenhados para amplificação parcial da proteína N, tanto o fragmento de 955pb quanto o de 1,6kb apresentaram identidade com sequências gênicas do precursor das glicoproteínas de tospovírus localizadas no RNA M. A identidade máxima parcial destas sequências com a de outros tospovírus não ultrapassou 41%. Esses dados representaram mais uma evidência de que o vírus

encontrado infectando feijão no campo é de fato um isolado que pertence a uma nova espécie.

Contudo, é necessária a elucidação da sequência da proteína N para a determinação da posição taxonômica desta nova espécie. Como o vírus foi encontrado no Brasil e houve uma fraca reação cruzada com TSWV (ensaio de diferenciação sorológica) indicando o possível relacionamento com espécies americanas, oligonucleotídeos utilizados na amplificação da proteína N de outro tospovírus do grupo americano (recém caracterizado) disponíveis na literatura (Hassani-Mehraban *et al.*, 2010) também foram utilizados. Apesar da amplificação de um fragmento de massa próxima da esperada (700pb), a sequência clonada e sequenciada apresentou identidade com proteínas L de outros tospovírus. Entretanto, tal identidade só foi encontrada em nível de aminoácidos através da ferramenta BLASTX. Este resultado, semelhante ao identificado com as glicoproteínas, mostrou a baixa identidade em nível de nucleotídeos deste novo tospovírus com as demais espécies do gênero, o que impulsionou a busca por outras estratégias para resolver o seu genoma.

A última estratégia escolhida foi a construção de uma biblioteca de cDNA a partir de RNA de nucleocapsídeo purificado. Curiosamente, após sequenciamento dos clones obtidos, todas as sequências apresentavam identidade com RNA M e RNA L, não havendo sequências do RNA S, onde se encontra o gene da proteína N. Independentemente, após análises *in silico* das sequências obtidas, tornou-se nítido que o tospovírus encontrado em feijão é de fato uma nova espécie. As sequências do precursor glicoprotéico e da proteína L, assim como a caracterização estrutural e estudo filogenético de ambas, são apresentados a seguir.

3.4. Sequências genômicas do RNA M

As sequências de RNA obtidas via biblioteca de cDNA correspondentes ao segmento M do novo tospovírus formaram um único *contig* de 3498 pares de bases (pb). Desses nucleotídeos, 3423pb codificam o precursor das glicoproteínas Gn e Cc (GPp) e os 75pb restantes fazem parte da porção 3'UTR, não apresentando os 8 nucleotídeos terminais (AGAGCAAT) conservados e encontrados nos demais tospovírus. Apesar de apresentar a maior ORF entre as proteínas GPp já caracterizadas, esta ainda se encontra incompleta, condição notória pela ausência de códon de parada na sequência obtida.

Assim, até o momento, a proteína GPp de BeNMV apresenta 1141 aminoácidos, a maior entre as conhecidas, e massa molecular de 128,321 kDa (Tabela 3.2), atrás, somente, da proteína GPp de IYSV que apresenta 128,586 kDa.

Tabela 3.2. Tamanho e massa molecular parcial da proteína GPp de BeNMV e de outros tospovírus.

Acesso GenBank	Vírus	Nº de nucleotídeos	Nº de aminoácidos	Massa molecular (kDa)
*	BeNMV	3423	1141	128,321
DQ256125	CaCV	3366	1121	127,220
FJ822961	CCSV	3372	1123	127,547
AB274026	CSNV	3408	1135	127,500
NC_003620	GBNV	3366	1121	127,330
AY574055	GRSV	3402	1133	127,523
NC_003616	INSV	3333	1110	124,857
AF214014	IYSV	3411	1136	128,586
NC_008307	MYSV	3384	1127	128,271
AY574054	TCSV	3405	1134	127,775
NC_002050	TSWV	3408	1135	127,309
NC_010490	TZSV	3369	1122	127,589
NC_003841	WSMoV	3366	1121	127,628
AB274027	ZLCV	3408	1135	127,513

*A sequência obtida da proteína GPp de BeNMV ainda não foi depositada no GenBank até o momento. *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV); *Capsicum chlorosis virus* (CaCV); *Calla lily chlorotic spot virus* (CCSV); *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV); *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV); *Groundnut ringspot virus* (GRSV); *Impatiens necrotic spot virus* (INSV); *Iris yellow spot virus* (IYSV); *Melon yellow spot virus* (MYSV); *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV); *Tomato spotted wilt virus* (TSWV); *Tomato zonate spot virus* (TZSV); *Watermelon spotted wilt virus* (WSMoV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV).

Em relação ao nível de identidade da proteína GPp de BeNMV com outros tospovírus foi revelada uma baixa identidade da sequência de aminoácidos deste com os demais, até mesmo com os tospovírus do grupo americano (CSNV, GRSV, INSV, TCSV, TSWV e ZLCV) (Tabela 3.3). A maior identidade foi com o CSNV (36,1%) e a menor com o MYSV (30,6%). Assim, a diferença entre o mais próximo e o mais distante foi de apenas 5,5%. Isso indicou certo distanciamento e características intrínsecas da proteína GPp deste novo tospovírus em relação às demais independentemente da procedência geográfica dos tospovírus analisados.

Tabela 3.3. Análise da identidade em aminoácidos (%) da proteína GPP de diferentes tospovírus

	BeNMV	TSWV	TCSV	GRSV	CSNV	ZLCV	INSV	IYSV	CaCV	CCSV	GBNV	MYSV	TZSV	WSMoV
BeNMV	100	35,8	35,3	35,1	36,1	35,6	33,2	30,9	31,1	31,8	31,9	30,6	31,7	31,6
TSWV		100	81,3	81,2	86,4	80,4	62,1	34,4	33,7	33,1	33,8	32,5	33,4	33,7
TCSV			100	96,6	80,3	77,2	60,4	33,8	33,8	33,8	34,1	32,8	34,3	33,7
GRSV				100	80	76,9	59,9	34	33,8	33,7	33,8	33	34,1	33,6
CSNV					100	82,6	61,2	34,1	33,9	33,2	34,4	33,3	33,4	33,9
ZLCV						100	60,2	35,6	34,5	34	34,8	32,7	33,7	34,5
INSV							100	33,8	33,3	33,8	34,3	33,7	33,4	33,8
IYSV								100	61,2	60,3	61,7	55,4	60,6	61,2
CaCV									100	71,5	87,3	65,4	71,6	84,4
CCSV										100	73,5	64,2	91,6	71,4
GBNV											100	65	73,7	88,8
MYSV												100	64,1	63,8
TZSV													100	71,9
WSMoV														100

Bean necrotic mosaic virus (BeNMV); Capsicum chlorosis virus (CaCV); Calla lily chlorotic spot virus (CCSV); Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV); Groundnut bud necrosis virus (GBNV); Groundnut ringspot virus (GRSV); Impatiens necrotic spot virus (INSV); Iris yellow spot virus (IYSV); Melon yellow spot virus (MYSV); Tomato chlorotic spot virus (TCSV); Tomato spotted wilt virus (TSWV); Tomato zonate spot virus (TZSV); Watermelon spotted wilt virus (WSMoV) e Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV).

Na caracterização topológica da proteína GPp do novo tospovírus foram feitas predições de padrões de N e O-glicosilação, sítios de clivagem, busca por regiões transmembrânicas e por domínios conservados (Figura 3.6). Foram encontrados seis potenciais sítios de N-glicosilação (Asn₁₂₃, Asn₂₀₇, Asn₃₂₀, Asn₃₆₀, Asn₅₂₁ e Asn₁₀₄₈), no entanto, nenhum de O-glicosilação. Assim como nas demais proteínas GPp de tospovírus, foram encontrados dois potenciais sítios de clivagem. O primeiro na extremidade N-terminal entre os aminoácidos Leu₂₀ e Asp₂₁, logo após um provável peptídeo sinal. Já o segundo sítio de clivagem entre os aminoácidos Ala₄₆₈ e Met₄₆₉, potencialmente responsável pela separação das duas glicoproteínas do envelope viral, Gn e Gc (“n” e “c” referentes a sua localização no precursor, N(amino) e C(carboxi)-terminal).

Para predição das regiões transmembrânicas foram considerados os resultados de dois programas, TMHMM Server v. 2.0 e InterProScan. No total foram encontradas quatro potenciais regiões transmembrânicas, mas apenas duas (297aa ao 319aa e 326aa ao 348aa) foram consenso entre os programas utilizados. A região mais N-terminal (5aa ao 25aa) foi somente prevista pelo programa InterProScan e a mais C-terminal (1075aa ao 1097aa) pelo programa TMHMM Server v. 2.0. Todas foram consideradas, pois o resultado conjunto é mais similar ao encontrado em outros tospovírus.

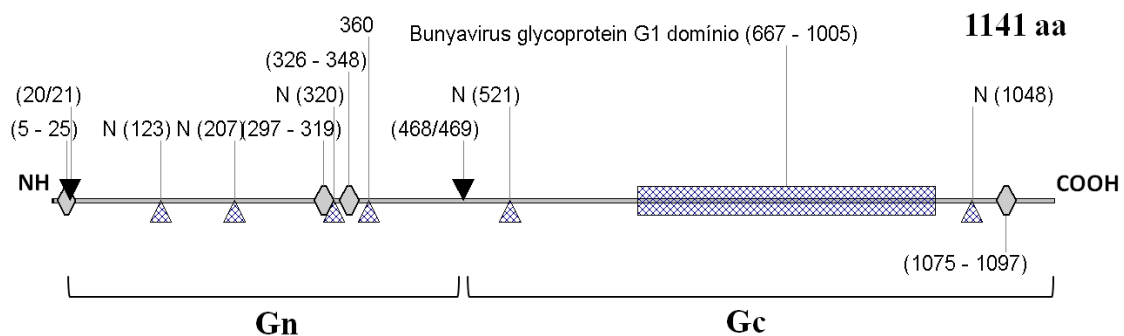


Figura 3.6. Topologia do precursor glicoprotéico do BeNMV. Triângulos pretos invertidos representam os sítios de clivagem; losangos cinza são correspondentes a localização das regiões transmembrânicas; triângulos quadriculados representam os pontos de N-glicosilação; e o retângulo quadriculado representa a localização do domínio *Bunyavirus glycoprotein G1*. A posição em aminoácidos está indicada entre parênteses.

No que diz respeito a domínios, primeiramente foi encontrado através da ferramenta BLAST e do programa InterProScan o domínio *Bunyavirus glycoprotein G1* (Pekosz *et al.*, 1995; Pekosz & Gonzalez-Scarano, 1996). Este compreende vários motivos conservados dentro do gênero *Tospovirus* e entre um ou mais gêneros da

família *Bunyaviridae*. Um exemplo é o motivo TSXWGCEE₇₂₆₋₇₃₃ conservado entre os tospovírus e também encontrado em espécies de *Orthobunyavirus* (Nagata *et al.*, 2007). Outro domínio encontrado foi o RGD₂₉₋₃₁ (porção N-terminal) envolvido na interação tospovírus-trípes (Kikkert *et al.*, 1998).

3.5. Sequências genômicas do RNA L

As sequências obtidas via biblioteca de cDNA correspondentes ao segmento L formaram 4 *contigs*. As lacunas entre esses *contigs* foram fechadas através de PCR com a utilização de oligonucleotídeos específicos como ilustrado na figura 3.7. Os oligonucleotídeos foram: LGAP1-F (5'GGAAGAAACCTTTGAAAAGCAC3'), LGAP1-R (5'AAATCGAAGATGCCCATCT3'), LGAP2-F (5'TGACCACAGGAGAAGCAAACCT3'), LGAP2-R (5'TGGACCATCCATCTTGTGGTAA3'), LGAP3-F (5'TACCTTGAAGAGCTAGAGGAAGC3') e LGAP3-R (5'GACCTGTGGGTTTCCCTATTC3'). A determinação ordinal dos fragmentos foi realizada através da tradução das sequências e utilização da ferramenta BLASTX, responsável pela comparação dos dados gerados com as sequências depositadas no GenBank. Assim, foi obtida a sequência completa ou quase completa do segmento L de BeNMV, já que não foram observados os oito nucleotídeos terminais conservados entre os tospovírus. A sequência do segmento L de BeNMV foi depositada no GenBank sob o acesso JF417980.

O segmento L de BeNMV possui 9040pb, o maior conhecido, sendo 8799pb referentes a fase aberta de leitura de sua RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) ou proteína L. Os nucleotídeos remanescentes, 21pb e 220pb, compreendem as regiões 3' e 5'UTR, respectivamente. Assim sendo, a proteína L é constituída por 2932 aminoácidos com massa molecular de 335,996 kDa, tornando-se a maior RNA polimerase de tospovírus conhecida até o momento (Tabela 3.4). Em nível de aminoácidos, a proteína L de BeNMV apresenta maior identidade (42,7%) com GRSV e INSV e a menor (40,9%) com TZSV, dentre os tospovírus que possuem o RNA L sequenciado (Tabela 3.5). Como resultado, a diferença percentual entre a maior e menor identidade foi de apenas 1,8% após comparação com todos os outros tospovírus, tanto do grupo Americano quanto do grupo Euroasiático. Isso mostrou que BeNMV é um

tospovírus praticamente equidistante aos demais no que diz respeito a sequência de aminoácidos de sua proteína L.

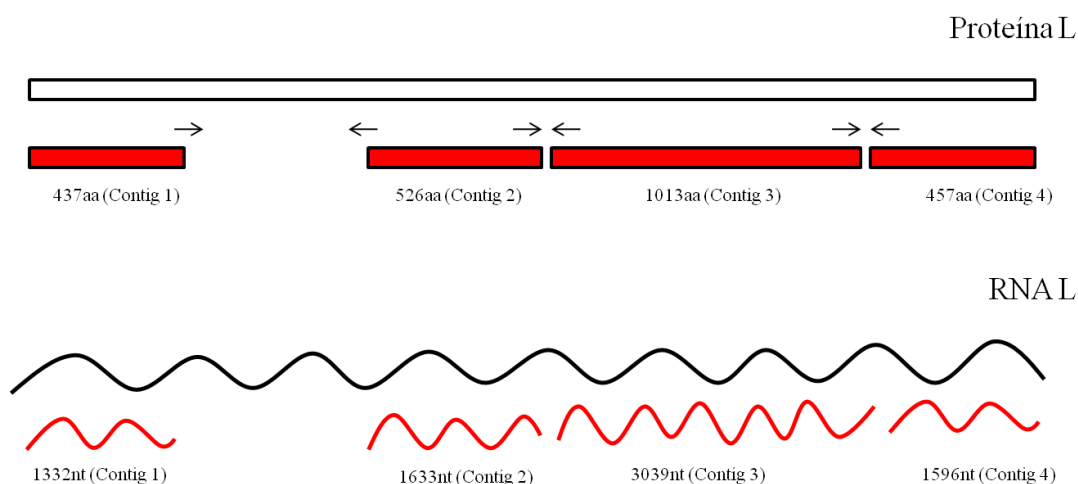


Figura 3.7. Esquema para finalização do sequenciamento da proteína L do *Bean necrotic mosaic virus*. As linhas flexuosas e as barras vermelhas representam as sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas através da biblioteca de cDNA, respectivamente. Abaixo delas encontram-se entre parênteses o tamanho de cada molécula. A linha flexuosa e barra com contorno preto representam as moléculas inteiras, hipoteticamente. As setas entre as barras vermelhas delimitam as regiões obtidas por PCR com a utilização de oligonucleotídeos

A predição de domínios na proteína L de BeNMV foi realizada, primeiramente, com o programa InterProScan. Este revelou dois domínios imprescindíveis, presentes nas RdRp de todos os tospovírus. O primeiro entre Thr₁₃₃₈ e Tyr₁₅₃₀, que apresenta motivos conservados em vírus com genoma de RNA senso negativo (*Negative-strand RNA virus domain*) e, o segundo e maior, entre Lys₈₁₆ e Asp₁₆₅₇, presente nos bunyavírus (*RdRp, bunyaviral domain*). Além disso, foi confirmada a presença dos aminoácidos conservados na porção N-terminal (H₉₉, D/E₁₃₁, PD₁₆₃₋₁₆₄, DXK₁₈₃₋₁₈₅ e T/K₁₉₆) relacionados à atividade de endonuclease, essencial na transcrição viral dependente de *cap snatching* (Reguera *et al.*, 2010). Outro ponto interessante da proteína L de BeNMV é a presença de uma extensão carboxi-terminal de aproximadamente 67 aminoácidos inexistente nos demais tospovírus. Além disso, esta extensão apresenta uma região de baixa complexidade rica em lisina (KGINLNPKKSK KKKKGKSKHK₂₉₁₀₋₂₉₃₂). A figura 3.8 esquematiza as informações descritas neste parágrafo.

Tabela 3.4. Tamanho e massa molecular da proteína L de BeNMV e de outros tospovírus.

Acesso GenBank	Vírus	Nº de nucleotídeos	Nº de aminoácidos	Massa molecular (kDa)
JF417980	BeNMV	8799	2932	335,996
NC_008302	CaCV	8634	2877	331,303
FJ822961	CCSV	8652	2883	332,023
NC_003614	GBNV	8634	2877	330,902
HQ700667	GRSV	8622	2873	330,716
NC_003625	INSV	8598	2865	330,237
FJ623474	IYSV	8622	2873	331,116
AB061774	MYSV	8613	2870	330,188
NC_002052	TSWV	8628	2875	331,479
NC_010491	TZSV	8658	2885	333,074
NC_003832	WSMoV	8637	2878	331,752

Bean necrotic mosaic virus (BeNMV); Capsicum chlorosis virus (CaCV); Calla lily chlorotic spot virus (CCSV); Groundnut bud necrosis virus (GBNV); Groundnut ringspot virus (GRSV); Impatiens necrotic spot virus (INSV); Iris yellow spot virus (IYSV); Melon yellow spot virus (MYSV); Tomato spotted wilt virus (TSWV); Tomato zonate spot virus (TZSV); Watermelon spotted wilt virus (WSMoV).

Tabela 3.5. Análise da identidade em aminoácidos (%) da proteína L de diferentes tospovírus

	BeNMV	TSWV	GRSV	INSV	CaCV	CCSV	GBNV	IYSV	MYSV	TZSV	WSMoV
BeNMV	100	41,4	42,7	42,7	41,8	41,7	42,2	41,8	42,5	40,9	42,1
TSWV		100	85,2	68,2	43,4	42,9	43,3	43,6	43,4	43,2	43
GRSV			100	71,6	45,1	44,9	45	46	45,4	44,7	45,1
INSV				100	44,6	44,3	44,7	45,5	44,6	44,2	45,3
CaCV					100	76,5	89,9	68,2	75,9	76	90,6
CCSV						100	76,2	66,3	73,7	88,6	76,8
GBNV							100	67,3	75,9	75,4	91,2
IYSV								100	67,2	65,5	68,1
MYSV									100	73	75,5
TZSV										100	76,2
WSMoV											100

Bean necrotic mosaic virus (BeNMV); Capsicum chlorosis virus (CaCV); Calla lily chlorotic spot virus (CCSV); Groundnut bud necrosis virus (GBNV); Groundnut ringspot virus (GRSV); Impatiens necrotic spot virus (INSV); Iris yellow spot virus (IYSV); Melon yellow spot virus (MYSV); Tomato spotted wilt virus (TSWV); Tomato zonate spot virus (TZSV); Watermelon spotted wilt virus (WSMoV).

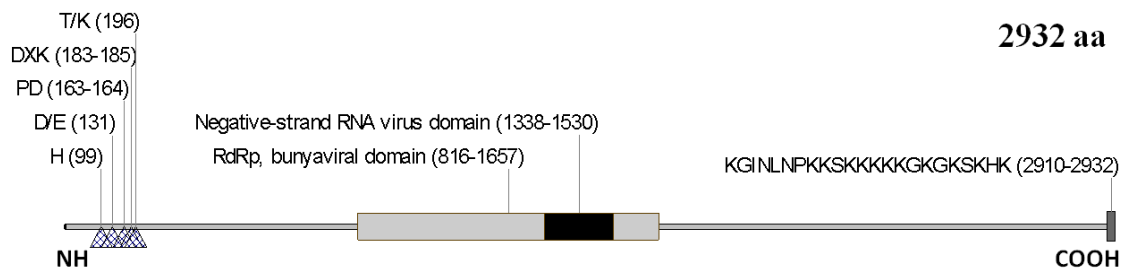


Figura 3.8. Caracterização da RNA polimerase dependente de RNA de BeNMV. Os triângulos quadriculados na porção N-terminal indicam a posição dos aminoácidos conservados relacionados à atividade de endonuclease da proteína. Os retângulos cinza claro e preto indicam a localização dos domínios disponibilizados pelo programa InterProScan. Na porção C-terminal encontra-se a localização da região de baixa complexidade rica em lisina exclusiva do BeNMV até o momento.

3.6. Análise filogenética

As sequências de aminoácidos da proteína GPp e da proteína L foram utilizadas para construção de duas árvores filogenéticas (Figura 3.9). Como resultado e em concordância com a análise de identidade (Tabelas 3.3. e 3.5.), o BeNMV mostrou-se um tospovírus bastante distinto quando comparado com os demais. Para ambas as árvores e assim como esperado, dois grupos foram formados, um americano e outro euroasiático. Na árvore da proteína GPp, BeNMV apresentou-se mais próximo do grupo americano, apesar de formar uma ramificação a parte. Entretanto, no caso da proteína L, o BeNMV mostrou-se ainda mais distinto e posicionou-se fora dos dois grupos principais, gerando um potencial novo grupo dentro do gênero *Tospovirus*.

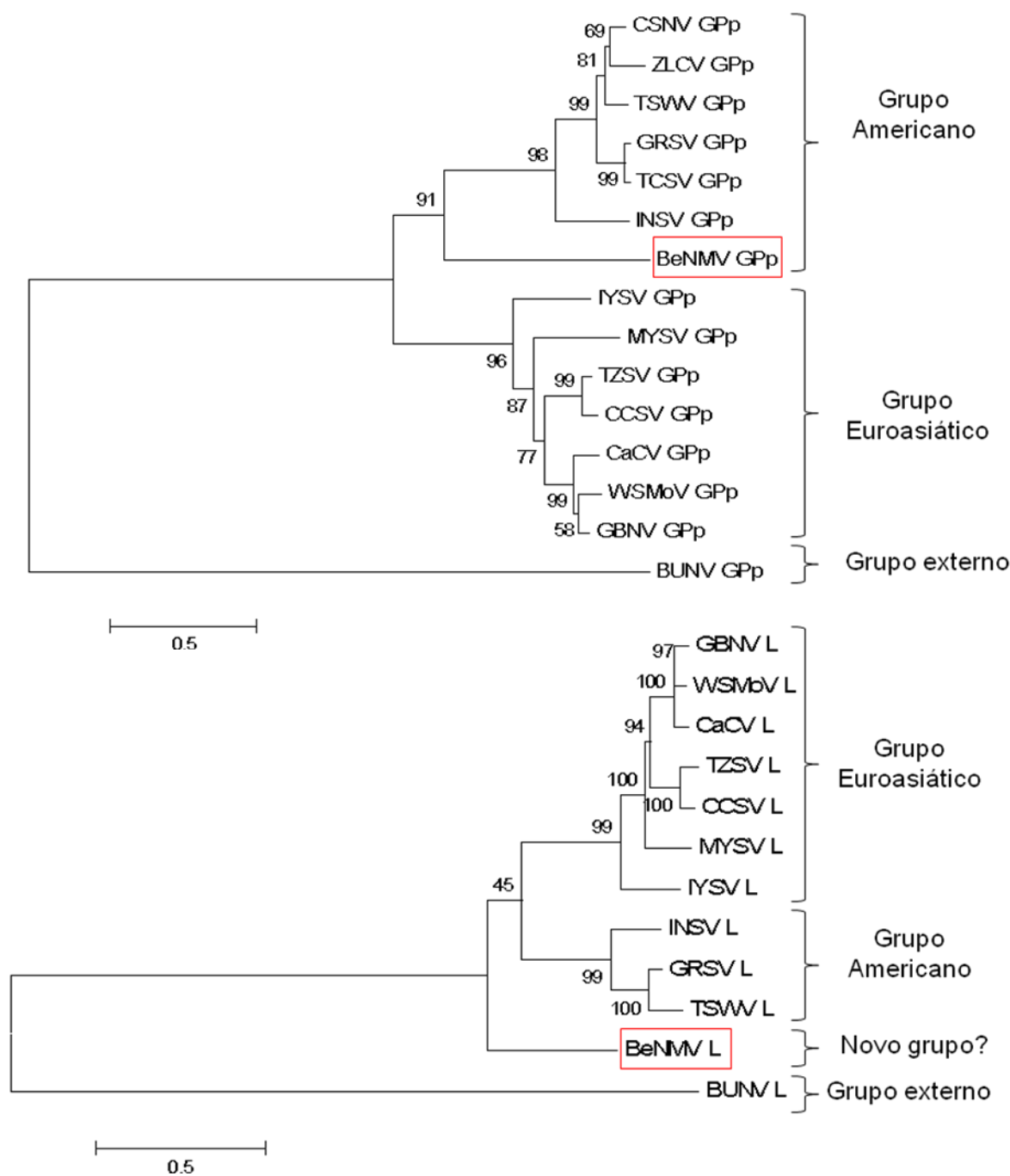


Figura 3.9. Árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de aminoácidos das proteínas GPp (A) e L (B). As árvores foram construídas com o programa MEGA 5, utilizando-se o método estatístico Maximum likelihood e bootstrap de 1000 replicatas. Os acessos (GenBank) das seqüências são os mesmo descritos nas tabelas de análise de identidade, com exceção do *Bunyamwera virus* (BUNV), gênero *Orthobunyavirus*, com acesso NC_001925. *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV); *Capsicum chlorosis virus* (CaCV); *Calla lily chlorotic spot virus* (CCSV); *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV); *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV); *Groundnut ringspot virus* (GRSV); *Impatiens necrotic spot virus* (INSV); *Iris yellow spot virus* (IYSV); *Melon yellow spot virus* (MYSV); *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV); *Tomato spotted wilt virus* (TSWV); *Tomato zonate spot virus* (TZSV); *Watermelon spotted wilt virus* (WSMoV) e *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho um novo e distinto tospovírus foi descoberto infectando feijão (*Phaseolus vulgaris*), sendo mosaico com áreas necróticas o principal sintoma apresentado por esse hospedeiro natural. Assim, é sugerido o nome tentativo de *Bean necrotic mosaic virus* (BeNMV) para esta nova espécie de tospovírus.

A transmissão por inoculação mecânica e, conseqüentemente, a multiplicação viral para fins experimentais deste novo tospovírus mostraram-se complicadas pelo estreito espectro de hospedeiros. Apenas *Datura stramonium*, *Physalis pubescens* e *Phaseolus vulgaris* cv. Santana mostraram-se susceptíveis. Apesar da transmissão deste novo tospovírus para o seu hospedeiro natural, os sintomas observados no campo não foram totalmente reproduzidos em casa de vegetação. Além disso, apenas uma dentre três variedades de feijão testadas foi suscetível após várias tentativas via inoculação mecânica.

A dificuldade de transmissão ou a não transmissão por inoculação mecânica para o hospedeiro natural já foi descrita por Hassani-Mehraban e colaboradores (2010) no processo de caracterização do tospovírus *Alstroemeria necrotic streak virus*. No caso de BeNMV, uma infecção mais eficiente em feijão poderia ser realizada por uma ou mais espécies de tripes vetores. Estudos de transmissão e identificação de tripes vetores ou até mesmo outros potenciais invertebrados vetores no campo de coleta devem ser realizados para um melhor entendimento epidemiológico do processo de transmissão. A especulação de uma nova espécie de tripes vetor também é impulsionada pela distinção genômica deste novo tospovírus e por seu diferente comportamento biológico. Assim como o *Zucchini lethal necrosis virus* que possui espectro de hospedeiros peculiar e vetor exclusivo (*Frankliniella zucchini*) (Bezerra *et al.*, 1999; Nakahara & Monteiro, 1999), o BeNMV pode ter como vetor uma nova espécie de tripes, diferentemente das habituais compartilhadas pelos outros tospovírus presentes no Brasil. É importante mencionar que BeNMV é a primeira nova espécie de tospovírus a infectar naturalmente feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), apesar de relatos de infecção de *Phaseolus vulgaris* por TSWV. Entretanto, não se pode ignorar a natureza cosmopolita de TSWV e seu amplo espectro de hospedeiros (Pappu *et al.*, 2009).

A diferença significativa entre o sintoma principal no campo (mosaico necrótico) e o observado após inoculação mecânica (clorose internerval) pode ter origem pela

diferença genotípica do *Phaseolus vulgaris* coletado com a variedade “Santana”, a única sintomática e infectada, utilizada no ensaio de transmissão mecânica. Tal desencontro ocorreu pelo desconhecimento da variedade presente no campo. Não obstante, possíveis interferências de cunho ambiental também não podem ser descartadas.

Outro ponto especulado desde o início da realização dos experimentos era a proximidade evolutiva de BeNMV com os tospovírus caracterizados no Brasil. Tal especulação foi primeiramente embasada a partir da origem geográfica da amostra coletada. Até o momento todos os tospovírus descobertos no Brasil são filogeneticamente próximos, com exceção de IYSV que, no entanto, foi primeiramente observado nos Estados Unidos e posteriormente caracterizado na Holanda (Hall *et al.*, 1993; Cortês *et al.*, 1998; Pozzer *et al.*, 1999). Além disso, as amostras de feijão apresentaram uma fraca reação cruzada com TSWV por ELISA (dados não mostrados) que, posteriormente, foi confirmada a partir da produção de anticorpos policlonais anti-BeNMV e realização de Dot-ELISA (Figura 3.5). Entretanto, o novo tospovírus apresentou-se diferente em relação aos demais, já que nenhum dos primers desenhados a partir de regiões conservadas ou degenerados conseguiu amplificar integralmente ou parcialmente a proteína do nucleocapsídeo, utilizada na classificação taxonômica das espécies do gênero *Tospovirus* (Fauquet *et al.*, 2005). Toda essa dificuldade de obtenção da sequência genômica da proteína N indicou prováveis características intrínsecas de BeNMV que depois foram sustentadas e apresentadas com a obtenção das sequências do RNA viral das outras proteínas estruturais.

O precursor das glicoproteínas Gn e Gc de BeNMV apresentou um baixo grau de identidade com os demais (Tabela 3.3). Apesar da sequência apresentada neste trabalho ser parcial, esta molécula é a maior já conhecida, apresentando até o momento 1141 aminoácidos. Muitas funções já foram validadas para as glicoproteínas Gn e Gc, principalmente relacionadas a interação tospovírus-tripes e no processo de maturação das partículas virais. A glicoproteína Gn, por exemplo, comportou-se como um ligante viral que medeia a ligação de TSWV a receptores posicionados nas células epiteliais do intestino médio de tripes (Whitfield *et al.*, 2004). Além disso, o domínio citoplasmático de Gn foi requerido na localização estratégica de cisternas do complexo de Golgi no processo de maturação e na interação com a glicoproteína Gc (Snippe *et al.*, 2007b). Esta, por sua vez, também se mostrou ativa na modificação e formação de vesículas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi no processo de maturação de partículas

em células vegetais (Ribeiro *et al.*, 2008). Ainda, Gc já mostrou interação com a proteína N, sugerindo sua atuação no envolvimento dos ribonucleocapsídeos pelas cisternas do Golgi (Snippe *et al.*, 2007). Assim como observado em TSWV, a proteína GPp de BeNMV apresentou quatro regiões transmembranas (Figura 3.6), contudo, a maioria dos tospovírus apresentam cinco regiões transmembranas (Knierim *et al.*, 2006). O padrão de inserção das glicoproteínas de BeNMV nas vesículas das células hospedeiras podem ser homólogos aos observados em TSWV, com isso, é considerável que aspectos funcionais possam ser extrapolados para esta nova espécie de tospovírus.

O segmento L de BeNMV é o maior já sequenciado, apresentando 9040pb e codificando a maior RNA polimerase dependente de RNA de tospovírus conhecida até o momento com 2932 aminoácidos e massa molecular de 335,996 kDa. Por executar funções essenciais e conservadas entre todos os bunyavírus, já era esperada uma maior identidade da sequência de aminoácidos da proteína L de BeNMV com os demais tospovírus quando comparada com a proteína GPp. As proteínas L de tospovírus e dos demais bunyavírus são responsáveis por diversas tarefas no processo de infecção e propagação viral tanto no hospedeiro vegetal ou vertebrado quanto no seu vetor. Assim, vários motivos conservados são esperados entre as moléculas de diferentes espécies ou até mesmo entre vírus de diferentes famílias, como é o caso do domínio *Negative-strand RNA virus* (referências no programa InterProScan) com motivos conservados de tospovírus (*Bunyaviridae*) a influenza (*Orthomyxoviridae*). Nesse sentido, também foi realizada a busca e encontrado os aminoácidos conservados na porção N-terminal relacionados à atividade de endonuclease. O domínio com esses aminoácidos foi estruturalmente e funcionalmente caracterizado em *La crosse orthobunyavirus* (LACV), mostrando-se essencial na transcrição viral dependente de *cap snatching* (Reguera *et al.*, 2010). Entretanto, a proteína L de BeNMV apresenta características intrínsecas já imaginadas por seu tamanho e grau de identidade com os demais tospovírus. Um exemplo é sua extensão C-terminal com extremidade rica em lisina com função a ser investigada. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de ser uma extensão molecular vestigial não funcional.

Após construção de duas árvores filogenéticas baseadas nas sequências de aminoácidos dessas duas proteínas estruturais, tornou-se nítida e visual a divergência genômica e até mesmo biológica de BeNMV em relação aos demais tospovírus (Figura 3.9.). Independentemente da obtenção e análise da sequência de aminoácidos da

proteína N, utilizada como critério taxonômico, é clara a posição de BeNMV como uma nova espécie de tospovírus. Até porque as proteínas L, quando utilizadas como fonte de dados na construção de árvores filogenéticas, apresentam grau de confiabilidade maior para os eventos de ramificação em comparação a árvores que utilizam a proteína N (Bertran *et al.*, 2011). Assim, é provável que uma árvore construída a partir da sequência da proteína N de BeNMV, ainda não obtida, seja semelhante a apresentada na figura 3.9. Entretanto, não se pode ignorar a árvore filogenética construída a partir das proteínas GPp em uma interpretação de proximidade evolutiva de BeNMV com os outros tospovírus. Com isso, o novo tospovírus caracterizado neste trabalho pode ter uma maior proximidade com os vírus do grupo americano (TSWV, TCSV, GRSV, CSNV, ZLCV e INSV), no entanto, é mais adequado classificá-lo como uma espécie representante de uma nova ramificação dentro do gênero *Tospovirus*. Tal afirmação não é sustentada, apenas, pela árvore baseada nas proteínas L, mas também por todas as características especiais apresentadas por este novo tospovírus no decorrer deste trabalho.

Outro ponto importante é o potencial impacto econômico deste novo tospovírus em um futuro longínquo ou até mesmo próximo, já que o hospedeiro natural é *Phaseolus vulgaris*. A produção brasileira de feijão apresenta média de 3,5 milhões de toneladas anuais com projeções de consumo de 4,31 milhões de toneladas para 2019/2020 (MAPA, 2011). O consumo *per capita* de feijão no Brasil é de aproximadamente 16,5 kg por habitante em um ano, sendo uma das leguminosas mais consumidas no país (MAPA, 2011). Com isso, a caracterização de BeNMV se faz importante caso este novo tospovírus venha a se tornar um problema na produção de *Phaseolus vulgaris*. Além disso, considerando que várias espécies de tripes vetores estão presentes no país, seria importante testar a capacidade de transmissão e infecção deste vírus em outras leguminosas, pois isolados desta nova espécie podem representar uma nova ameaça ao cultivo dessas culturas no Brasil.

Vários estudos ainda precisam ser realizados para um maior entendimento das relações ecológicas, celulares e moleculares de BeNMV com seus hospedeiros. Nesse sentido, ensaios de transmissão por tripes, impacto na fisiologia vegetal e outros estudos de aceção epidemiológica são necessários. Trabalhos de ultraestrutura e comportamento das proteínas virais também são importantes pelo grau de diferenciação de BeNMV em relação aos demais integrantes do gênero. Além disso, novos esforços

serão realizados para término do sequenciamento do genoma deste novo e distinto tospovírus brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adkins, S. Tomato spotted wilt virus – positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology*. 1: 151-157. 2001.

Adkins, S.; Quadt, R.; Choi, T.J.; Ahlquist, P.; German, T. An RNA-dependent RNA polymerase activity associated with virions of tomato spotted wilt virus, a plant- and insect-infecting Bunyavirus. *Virology*. 207: 308-311. 1995.

Aramburu, J. & Marti, M. The occurrence in north-east Spain of a variant of tomato spotted wilt virus (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the SW-5 gene. *Plant Pathology*. 52: 407. 2003.

Bendtsen, J.D.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunak, S. Improved prediction of signal peptides – SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*. 340: 783–795. 2004.

Bertran, A.G.M.; Oliveira, A.S.; Nagata, T.; Resende, R.O. Molecular characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from Groundnut ringspot virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of Virology*. Submitted. 2011.

Bezerra, I.C.; Resente, R.O.; Pozzer, L.; Nagata, T.; Kormelink, R.; De Ávila, A.C. Increase of Tospoviral Diversity in Brazil with the Identification of Two New Tospovirus Species, One from Chrysanthemum and One from Zucchini. *Virology*. 89: 823-830. 1999.

Black, L.L.; Hobbs, H.A.; Gatti, J.M.Jr. Tomato spotted wilt virus resistance in *Capsicum chinense* PI152225 and 159236. *Plant Disease*. 75: 863. 1991.

Boiteux, L.S. & Giordano, L.B. Genetic basis of resistance against two tospovirus species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica*. 71: 151-154. 1993.

Brittlebank, C.C. Tomato diseases. *Journal of Agriculture*. 17: 231-235. 1919.

Brommonschenkel, S.H.; Frary, A.; Frary, A.; Tanksley, S.D. The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. *MPMI*. 13: 1130-1138. 2000.

Bucher, E.; Lohuis, D.; van Poppel, P.M.J.A.; Geerts-Dimitriadou, C.; Goldbach, R.; Prins, M. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *Journal of General Virology*. 87: 3697-3701. 2006.

Chapman, E.J.; Hilson, P.; German, T.L. Association of the L protein and in vitro tomato spotted wilt virus RNA-dependent RNA polymerase activity. *Intervirology*. 46: 177-181. 2003.

Cho, J.J.; Custer, D.M.; Brommonschenkel, S.H.; Tanksley, S.D. Conventional breeding: host-plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to tomato spotted wilt virus in vegetables. *Acta horticulturae*. 431: 367-378. 1996.

Colariccio, A.; Eiras, M.; Chaves, A.L.R.; Harakava, R.; Chagas, C.M. Tomato chlorotic spot virus in hydroponic-grown lettuce in São Paulo state, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 29:307-311. 2004.

Cortês, I.; Livieratos, I.C.; Derks, A.; Peters, D.; Kormelink, R. Molecular and serological characterization of Iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology*. 88: 1276-1282.

Cortez, I.; Saaijer, J.; Wongjkaew, K.S.; Pereira, A.M. Goldbach, R.; Peters, D.; Kormelink, R. Identification and characterization of a new tospovirus species using a new RT-PCR approach. *Archives of Virology*. 146: 265-278. 2001.

De Ávila, A. C.; De Haan, P.; Smeets, M. L. L.; Resende, R. O.; Kitajima, E. W.; Goldbach, R.W.; Peters, D. Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. *Arch. Virol.* 128:211-227. 1993b.

De Ávila, A.C.; de Haan, P.; Kormelink, R.; Resende, R. de O.; Goldbach, R.W.; Peters, D. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology*. 128: 211-227. 1993.

De Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K.; Costa, H.; Boiteux, L.S.; Neves, L.O.Q.; Prates, R.S.; Bertini, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira*. 22: 655-658. 2004.

De Haan, P.; Gielen, J.J.L.; Prins, M.; Wijkamp, I.G.; van Schepen, A.; Peters, D.; van Grinsven, M.Q.M.; Goldbach, R. Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology*. 10: 1133-1137. 1992.

De Haan, P.; Kormelink, R.; Resende, R.O.; van Poelwijk, F.; Peters, D.; Goldbach, R. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA-polymerase. *Journal of General Virology*. 72: 2207-2216. 1991.

De Haan, P.; Wagemakers, L.; Peters, D.; Goldbach, R. Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNAs of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*. 70: 3469-3473. 1989.

De Haan, P.; Wagemakers, L.; Peters, D.; Goldbach, R. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *Journal of General Virology*. 71: 1001-1007. 1990.

Dong, J.; Cheng, X.; Yin, Y.; Fang, Q.; Ding, M.; Li, T.; Zhang, L.; Su, X.; McBeath, J.; Zhang, Z. Characterization of tomato zonate spot virus, a new tospovirus in China. *Archives of Virology*. 153: 855-864. 2008.

Duijsings, D.; Kormelink, R.; Goldbach, R. Alfafa mosaic virus RNAs serve as cap donors for tomato spotted wilt virus transcription during co-infection of *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology*. 73: 5172-5175. 1999.

Duijsings, D.; Kormelink, R.; Goldbach, R. In vivo analysis of the TSWV cap snatching mechanism: single base complementarity and primer length requirements. *EMBO Journal*. 20: 1-8. 2001.

Eiras, M.; Chaves, A.L.R.; Colariccio, A.; Harakava, R.; Araújo, J.; Chagas, C.M. Caracterização do Tomato chlorotic spot virus isolado de jiló no vale do Paraíba, estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*. 27:285-291. 2002.

Elliott, R.M. Molecular biology of bunyaviridae. *Journal of General Virology*. 71: 501-502. 1990.

Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. *Virus Taxonomy, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London. 2005.

German, T.L.; Ullman, D.E.; Moyer, J.W. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review of Phytopathology*. 30: 315-348. 1992.

Giampan, J.S.; Rezende, J.A.M.; Piedade, S.M.S. Danos causados pelo Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) sobre a produção de frutos comerciais de abobrinha de moita 'Caserta'. *Summa Phytopathologica*. 35: 223-225, 2009.

Gupta, R.; Jung, E.; Brunak, S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation. 2004.

Hall, J.M.; Mohan, K, K.; Knott, E.A.; Moyer, J.W. Tospoviruses associated with scape blight of onion (*Allium cepa*) seed crops in Idaho. *Plant Disease*. 77: 952. 1993.

Hassani-Mehraban, A.; Botermans, M.; Verhoeven, J.T.J.; Meekes, E.; Saaijer, J.; Peters, D.; Goldbach, R.; Kormelink, R. A distinct tospovirus causing necrotic streak on *Alstroemeria* sp. in Colombia. *Archives of Virology*. 155: 423-428. 2010.

Julenius, K.; Molgaard, A.; Gupta, R.; Brunak, S. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15: 153-164. 2005.

Kikkert, M.; Meurs, C.; van de Wetering, F.; Dorfmüller, S.; Peters, D.; Kormelink, R. Goldbach, R. Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips protein. *Phytopathology*. 88: 63-69. 1998.

Kikkert, M.; van Lent, J.; Storms, M.; Bodegom, P.; Kormelink, R.; Goldbach, R. Tomato spotted wilt virus particles morphogenesis in plant cells. *Journal of Virology*. 73: 2288-2297. 1999.

Knierim, D.; Blawid, R.; Maiss, E. The complete nucleotide sequence of a capsicum chlorosis virus isolate from *Lycopersicon esculentum* in Thailand. *Archives of Virology*. 151: 1761-1782. 2006.

Kormelink, R.; De Haan, P., Meurs, C.; Peters, D.; Goldbach, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*. 73: 2795-2804. 1992.

Kormelink, R.; Storms, M.; Van Lent, J.; Peters, D.; Goldbach, R. Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*. 200: 56-65. 1994.

Krogh, A.; Larsson, B.; von Heijne, G.; Sonnhammer, E.L.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*. 305: 567–580. 2001.

Latham, L.J. & Jones, R.A.C. Occurrence of tomato spotted wilt tospovirus in native flora, weeds and horticultural crops. *Australian Journal of Agricultural Research*. 48: 359-369. 1997.

Li, W.; Lewandowski, D.J.; Hilf, M.E.; Adkins, S. Identification of domains of the tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology*. 390: 110-121. 2009.

López, C.; Aramburu, J.; Galipienso, L.; Soler, S.; Nuez, F.; Rubio, L. Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*. 92: 210-215. 2011.

Lovato, F.A.; Nagata, T.; Resende, R.O.; De Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K. Sequence analysis of the glycoproteins of tomato chlorotic spot virus and groundnut ringspot virus and comparison with other tospoviruses. *Virus Genes*. 29: 321-328. 2004.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Feijão. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/culturas/feijao>. Acesso em 21 de fev. 2011.

Milne, R.G.; Francki, R.I. Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family *Bunyaviridae*? *Intervirology*. 22: 72-76. 1984.

Moritz, G.; Kumm, S.; Mound, L. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research*. 100: 143-149. 2004.

Morse, J.G. & Hoddle, M.S. Invasion biology of thrips. *Annual Review of Entomology*. 51: 67-89. 2006.

Mound, L.A. The thysanoptera vector species of tospovirus. *Acta Horticulturae*. 431: 298-309. 1996.

Nagata, T.; Carvalho, K.R.; Sodré, R.A.; Dutra, L.S.; Oliveira, P.A.; Noronha, E.F.; Lovato, F.A.; Resende, R.O.; de Ávila, A.C.; Inoue-Nagata, A.K. The glycoprotein gene of Chrysanthemum stem necrosis virus and Zucchini lethal chlorosis virus and molecular relationship with other tospoviruses. *Virus Genes*. 35: 785-793. 2007.

Nagata, T.; Inoue-Nagata, A.K.; Smid, H.; Goldbach, R.; Peters, D. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*. 80: 507-515. 1999.

Nagata, T.; Inoue-Nagata, A.K.; van Lent J.; Goldbach, R.; Peters, D. Factors determining vector competence and specificity for transmission of tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*. 83: 663-671. 2002.

Nakahara, S. & Monteiro, R.C. *Frankliniella zucchini* (thysanoptera : thripidae), a new species and vector of tospovirus in brazil. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 101: 290-294. 1999.

Pang, S.Z.; Nagpala, P.; Wang, M.; Slightom, J.L.; Gonsalves, D. Resistance to heterologous isolates of tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco expressing its nucleocapsid protein gene. *Molecular Plant Pathology*. 82: 1223-1229. 1992.

Pappu, H.R.; Jones, R.A.C.; Jain, R.K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus research*. 141: 219-236. 2009.

Pekosz, A. & Gonzalez-Scarano, F. The extracellular domain of La Crosse virus G1 forms oligomers and undergoes pH-dependent conformational changes. *Virology*. 225: 243-247. 1996.

Pekosz, A.; Griot, C.; Nathanson, N.; Gonzalez-Scarano, F. Tropism of bunyaviruses: evidence for a G1 glycoprotein-mediated entry pathway common to the California serogroup. *Virology*. 214: 339-348. 1995.

Pettersson, R.F. & Melin, L. Synthesis, assembly, and intracellular transport of Bunyaviridae membrane proteins. In *The Bunyaviridae*. New York, Plenum Press., pp 159-188. 1996.

Pozzer, L.; Bezerra, I.C.; Kormelink, R.; Prins, M.; Peters, D.; Resende, R.O.; de Ávila, A.C. Characterization of a tospovirus isolate of Iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Disease*. 83: 345-350. 1999.

Prins, M.; Kikkert, M.; Ismayadi, C.; de Graauw, W.; de Haan, P.; Goldbach, R. Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants expressing Ns(m) gene sequence. *Plant Molecular Biology*. 33: 235-243. 1997.

Quevillon, E.; Silventoinen, V.; Pillai, S.; Harte, N.; Mulder, N.; Apweiler, R.; Lopez, R. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*. 33:W116-W120. 2005.

Reguera, J.; Weber, F.; Cusack, S. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *Plos Pathogens*. 6: e1001101. 2010.

Reitz, S.R. Biology and ecology of the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae): the making of a pest. *Florida entomologist*. 92: 7-13. 2009.

Resende, R. de O.; Posser, L.; Nagata, I.; Bezerra, C.; Lima, M.I.; Kitajima, E.W.; de Ávila, A.C. New tospoviruses found in Brazil. *Acta Horticulturae*. 431: 78-79. 1996.

Ribeiro, D.; Foresti, O.; Denecke, J.; Wellink, J.; Goldbach, R.; Kormelink, R.J.M. Tomato spotted wilt virus glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. *Journal of General Virology*. 89: 1811-1818. 2008.

Robb, K.L.; Newman, J.; Virzi, J.K.; Parrella, M.P. Insecticide resistance in western flower thrips. In: B. L. Parker, M. Skinner, and T. Lewis (Editors). *Thrips Biology and Management*. Plenum Press, New York. pp 33-40. 1995.

Roggero, P.; Masenga, V.; Travella, L. Field isolates of tomato spotted wilt virus overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Disease*. 86: 950-954. 2002.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Samuel, G.; Bald, J.G.; Pittman, H.A. Investigations on "spotted wilt" of tomatoes, Australia. *Commonw. Counc. Sci. Ind. Res. Bull.* 44:8-11. 1930.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings National Academy of the Science*. 74:5463-5467. 1977.

Silva, M.S.; Martins, C.R.F.; Bezerra, I.C.; Nagata, T.; De Ávila, A.C.; Resende, R.O. Sequence diversity of NSm movement protein of tospoviruses. *Archives of Virology*. 146: 1267-1281. 2001.

Snippe, M.; Smeenk, L.; Goldbach, R.; Kormelink, R. The cytoplasmic domain of tomato spotted wilt virus Gn glycoprotein is required for Golgi localization and interaction with Gc. *Virology*. 363: 272-279. 2007b.

Snippe, M.; Willem, B.L.; Goldbach, R.; Kormelink, R. Tomato spotted wilt virus Gc and N proteins interact in vivo. *Virology*. 357: 115-123. 2007.

Spassova, M.I.; Prins, T.W.; Folkertsma, R.T.; Klein-Lankhorst, R.M.; Hille, J.; Goldbach, R.W. Prins, M. The tomato gene Sw5 is a member of the coiled coil, nucleodite binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding*. 7: 151-161. 2001.

Staden R. The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*. 5: 233-241. 1996.

Stevens, M.R.; Scott, S.J. Gergerich, R.C. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*. 59: 9-17. 1992.

Storms, M.M.H.; Kormelink, R.; Peters, D.; Van Lent, J.W.M.; Goldbach, R.W. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*. 214: 485-493. 1995.

Storms, M.M.H.; Nagata, T.; Kormelink, R.; Goldbach, R.W. van Lent, J.W.M. Expression of the movement protein of tomato spotted wilt virus in its insect vector *Frankliniella occidentalis*. *Archives of Virology*. 147: 825-831. 2002.

Storms, M.M.H.; van der Schoot, C.; Prins, M.; Kormelink, R.; van Lent, J.W.M.; Goldbach, R.W. A comparison of two methods of microinjection for assessing altered plasmodesmal gating in tissues expressing viral movement proteins. *Plant J*. 13: 131-140. 1998.

Takeda, A.; Sugiyama, K.; Nagano, H.; Mori, M.; Kaido, Kazuyuki, M.; Tsuda, S. Okuno, T. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of tomato spotted wilt virus. *FEBS Lett*. 532: 75-79. 2002.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). 2011.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson TJ. CLUSTAL-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680. 1994.

Tijsterman, M.; Ketting, R.F.; Plasterk, R.H.A. The genetics of RNA silencing. *Annu. Rev. Genet*. 36: 489-519. 2002.

Tordo, N.; de Haan, P.; Goldbach, R.; Poch, O. Evolution of negative-stranded RNA genomes. *Semin. Virol*. 3: 341-357. 1992.

Ullman, D.E.; German, T.L.; Sherwood, J.L.; Westcot, D.M.; Custer, D.M. Tospoviral replication in insect vector cells: Immunocytochemical evidence that the non-structural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology*. 83: 456-463. 1993.

Ullman, D.E.; Westcot, D.M.; Chenault, K.D.; Sherwood, J.L.; German, T.L.; Bandla, M.D.; Cantone, F.A; Duer, H.L. Compartmentalization, intracellular transport, and

autophagy of tomato spotted wilt tospovirus proteins in infected thrips cells. *Phytopathology*. 85: 644-654. 1995.

Ultzen, T.; Gielen, J.J.L.; Venema, F.; Westerbroek, A.; de Haan, P.; Tan, M.L.; Schram, A.; van Grinsven, M.; Goldbach, R. Resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tomato hybrids. *Euphytica*. 85: 159-168. 1995.

Van de Wetering, F.; Goldbach, R.; Peters, D. Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology*. 86: 900-905. 1996.

Van Knippenberg, I.; Lamine, M.; Goldbach, R.; Kormelink, R. Tomato spotted wilt virus transcriptase in vitro displays a preference for cap donors with multiple base complementary to the viral template. *Virology*. 335: 122-130. 2005.

Van Poelwijk, F.; Boye, K.; Oosterling, R.; Peters, D.; Goldbach, R. Detection of the L protein of tomato spotted wilt virus. *Virology*. 197: 468-470.

Whitfield, A.; Ullman, D.E.; German, T.L. Expression and characterization of a soluble form of Tomato spotted wilt virus glycoprotein Gn. *Journal of Virology*. 78: 13197-13206. 2004.

Whitfield, A.E.; Ullman, D.E.; German, T.L. Tospovirus-thrips interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 459-489. 2005.

Wijkamp, I.; Van Lent, J.; Kormelink, R.; Goldbach, R.; Peters, D. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of General Virology*. 74: 341-349. 1993.

Wilson, C.R. Resistance to infection and translocation of Tomato spotted wilt virus in potatoes. *Plant Pathology*. 50: 402-410. 2001.

Zhao, G.; Liu, W.; Brown, J.M.; Knowles, O. Insecticide resistance in field and laboratory strains of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*. 88: 1164-1170. 1995.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília (UnB) por disponibilizar as instalações físicas para realização dos trabalhos de bancada e pela criação e organização do novo Instituto de Ciências Biológicas (IB).

Ao Departamento de Biologia Celular pela criação e organização do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular que apresenta excelentes indicadores de qualidade.

À EMBRAPA Hortaliças por disponibilizar sua estrutura de casas de vegetação e recursos humanos para o desenvolvimento de alguns experimentos.

Ao meu orientador Renato de Oliveira Resende pela orientação, confiança, competência e camaradagem. Também não posso esquecer-me de agradecer por sua compreensão e paciência, principalmente em relação aos erros experimentais e resultados negativos e, é claro, pelo meu humor. Além disso, por tornar o ambiente de trabalho sempre agradável e minimizar os momentos de tensão.

A Doutora Alice Kazuko Inoue Nagata, pesquisadora da EMBRAPA Hortaliças, pela co-orientação, pelas discussões experimentais, paciência, compreensão e pelo auxílio na revisão deste trabalho.

Ao professor Elliot Watanabe Kitajima pela identificação das plantas de feijão apresentando mosaico associado com necrose e especulação da presença de um provável novo tospovírus.

Aos professores do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia (UnB), Bergmann Morais Ribeiro, Tatsuya Nagata e José Raimundo Correa, pela disponibilidade em sempre discutir sobre as dúvidas e complicações experimentais e pela camaradagem.

Ao meu amigo André Gustavo Machado Bertran pelo auxílio em diversos experimentos, parceria científica, competência, otimismo e amizade. Que venham novas publicações!

Aos demais amigos e orientandos do professor Renato, Rayane Nunes Lima, Virgínia Carla de Oliveira e Mikhail de Oliveira Leastro, que tornam o nosso laboratório o mais agradável de todo o IB, além da amizade e compromisso científico.

Aos vizinhos e ex-vizinhos do Baculovírus, Mariana, Raul, Rafael, Daniel, Fabrício, Anabele, Roberto, Clarinha, Carol, Maria, Lorena, entre outros.

Aos vizinhos orientados pelo professor Tatsuya, Karol, Kelly, Natália, Adriana, Laíssa, Câmara, entre outros.

Aos estudantes e pesquisadores dos laboratórios de Virologia e Biologia Molecular da EMBRAPA Hortaliças, Dra Mirtes, Natália Nascimento, Natália Alencar, Gabriela, Bruna, Mônica, Mariana Martins, Mariana Hallwas, Bruna, Talita, Vinícius, Sara, entre outros, que me aturaram por mais de um ano.

Aos técnicos da Embrapa Hortaliça, Lúcio Flávio, Hamilton e Oneilson, pela paciência e auxílio nas atividades experimentais.

Aos estudantes e professores do Departamento de Fitopatologia, Rita de Cássia, Érico, Rosana, Bruninha, Claudênia, Cecília, Isadora, entre outros.

Aos membros da banca, Marília Santos Silva e mais uma vez Tatsuya Nagata, por investirem tempo na avaliação desta dissertação.

Aos meus pais, João e Eliane, por me auxiliarem em questões materiais, pela transmissão, ao longo dos anos, dos valores essenciais para a minha formação como indivíduo e por todo apoio a mim conferido durante os dois anos de realização do curso de Mestrado.

Á Deus, por me garantir disposição física e mental durante a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ilustração esquemática da partícula de um tospovírus.....	6
Figura 1.2. Organização genômica e estratégia de expressão de um tospovírus.....	8
Figura 1.3. <i>Phaseolus vulgaris</i> L. apresentando sintoma de mosaico necrótico.....	17
Figura 3.1. Micrografia eletrônica com partículas do novo tospovírus.....	23
Figura 3.2. <i>D. stramonium</i> L. (A), <i>P. pubescens</i> L. (B) e <i>Phaseolus vulgaris</i> L cv. Santana (C) mostrando sintomas causados pelo novo tospovírus.....	24
Figura 3.3. Confirmação sorológica da presença do novo tospovírus nas variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. Santana, Manteiga e BT2.....	24
Figura 3.4. Análise da fração de nucleocapsídeo purificado do novo tospovírus via SDS-PAGE mostrando a presença da proteína viral com tamanho aproximado de 29 kDa....	26
Figura 3.5. Diferenciação sorológica entre o novo tospovírus e outras espécies presentes no Brasil.....	27
Figura 3.6. Topologia do precursor glicoprotéico do BeNMV.....	32
Figura 3.7. Esquema para finalização do sequenciamento da proteína L do <i>Bean necrotic mosaic virus</i>	34
Figura 3.8. Caracterização da RNA polimerase dependente de RNA do BeNMV.....	36
Figura 3.9. Árvores filogenéticas baseadas nas sequências de aminoácidos das proteínas GPp (A) e L (B).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Tospovírus com vetores conhecidos.....	11
Tabela 3.1. Espectro de hospedeiros do novo tospovírus determinado via inoculação mecânica em diversas plantas.....	25
Tabela 3.2. Tamanho e massa molecular parcial da proteína GPp de BeNMV e de outros tospovírus	30
Tabela 3.3. Análise da identidade em aminoácidos (%) da proteína GPp de diferentes tospovírus	31
Tabela 3.4. Tamanho e massa molecular da proteína L de BeNMV e de outros tospovírus	35
Tabela 3.5. Análise da identidade em aminoácidos (%) da proteína L de diferentes tospovírus	35